Inhaltsstoffe von Arnica viscosa und Arnica nevadensis

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

MARION EBERT

aus Berlin

Düsseldorf 1985

UNIV.
LEIDEN
KAL.

Inhaltsstoffe von Arnica viscosa und Arnica nevadensis

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

MARION EBERT

aus Berlin

Düsseldorf 1985

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Willuhn

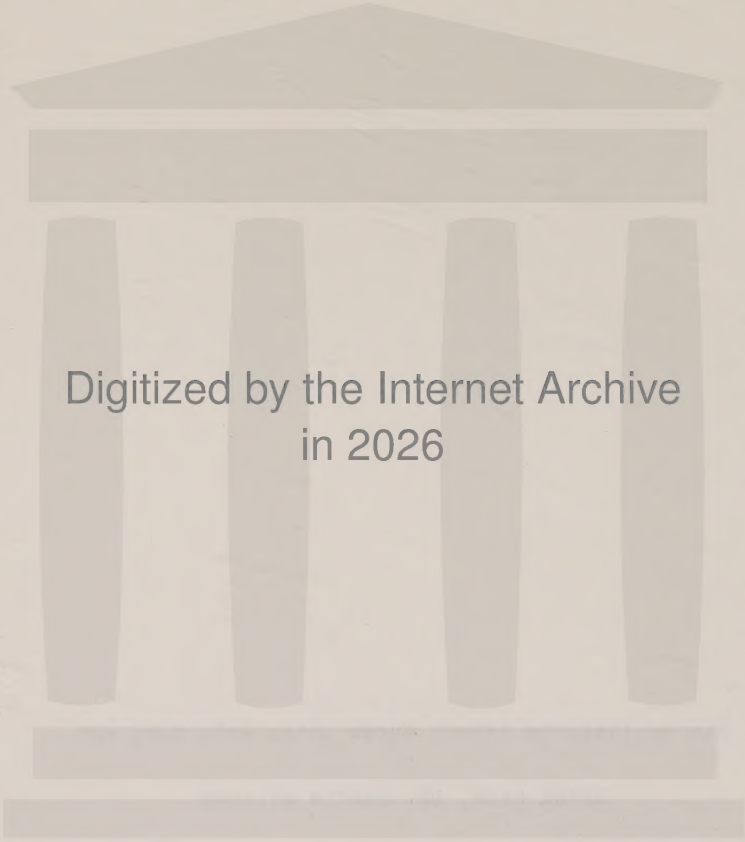
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1985

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von

HERRN PROF. DR. GÜNTER WILLUHN

am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf angefertigt. Für die stets großzügig gewährte Unterstützung und Förderung meiner Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Willuhn herzlich.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0006

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	ZUR CHEMIE UND BIOSYNTHESE DER SESQUITERPEN-LACTONE	11
3.	ZUR CHEMIE UND BIOSYNTHESE DER FLAVONOIDE	15
4.	ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER SESQUITER-PENLACTONE AUS DEM KRAUT VON ARNICA VISCOSA	18
4.1.	Gewinnung der mit Sesquiterpenlactonen und Flavonoiden angereicherten Extrakte	18
4.2.	DC-Analyse und säulenchromatographische Auftrennung des S1-Extraktes	18
4.2.1.	Isolierung und Identifizierung von 1 (6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalin)	20
4.2.2.	Isolierung und Identifizierung von 2 (11α,13-Dinydrohelenalin)	23
4.2.3.	Isolierung und Strukturaufklärung von 3 (2β-Hydroxy-6-O-acetyl-2,3,11α,13-tetra-hydrohelenalin)	27
4.2.4.	Identifizierung von 4 und 5 (Helenalin und 6-O-Acetylhelenalin)	36
4.3.	DC-Analyse und säulenchromatographische Auftrennung des Flavonoid-Extraktes	37
4.3.1.	Isolierung und Identifizierung von 6 (Apigenin-7,4'-dimethylether)	38
4.3.2.	Isolierung und Identifizierung von 7 (Genkwanin)	47
4.3.3.	Isolierung und Identifizierung von 8 (Naringenin-7,4'-dimethylether)	53
4.4.	Isolierung von 9 und 10	61
4.4.1.	Identifizierung von 9 (Persicogenin)	61
4.4.2.	Identifizierung von 10 (Sakuranetin)	68
4.5.	Isolierung von 11 und 12	72
4.5.1.	Identifizierung von 11 (Luteolin,7,3',4'-trimethylether)	73
4.5.2.	Identifizierung von 12 (Velutin)	78

4.6.	Isolierung und Identifizierung von 13 (Cirsimaritin)	84
5.	SESQUITERPENLACTONE UND FLAVONOIDE DER BLÜTENKÖRBCHEN VON ARNICA VISCOSA	91
6.	DAS ÄTHERISCHE ÖL DER RHIZOME, BLÄTTER UND BLÜTEN VON ARNICA VISCOSA	93
6.1.	Gehaltsbestimmung	93
6.2.	Gaschromatographische Auftrennung und DC-Analyse der ätherischen Öle	93
6.3.	Identifizierung der Hauptkomponenten des ätherischen Öles der Rhizome (16-22)	95
6.4.	GC- und GC/MS-Analyse des ätherischen Öls der Blätter und Blütenkörbchen	98
7.	KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER IN A. VISCOSA IDENTIFIZIERTEN VERBINDUNGEN	99
8.	ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER SESQUITERPENLACTONE UND FLAVONOIDE AUS DEN BLÄTTERN VON ARNICA NEVADENSIS A. GRAY	101
8.1.	Gewinnung der mit Sesquiterpenlactonen und Flavonoiden angereicherten Extrakte	101
8.2.	DC-Analyse und säulenchromatographische Auftrennung der SI-Extrakte	101
8.2.1.	Isolierung und Identifizierung von 26 (Ivalin)	102
8.2.2.	Isolierung und Identifizierung von 27 (2-O-Acetyl-ivalin)	110
8.2.3.	Isolierung und Identifizierung von 28 (Asperilin)	115
8.2.4.	Isolierung und Strukturaufklärung von 29 (11α,13-Dihydroivalin)	122
8.3.	DC-Analyse der Flavonoid-Fraktion	127
8.4.	Isolierung von 13, 30 und 31	128
8.4.1.	Identifizierung von 30 (Pectolinarigenin)	128
8.4.2.	Charakterisierung von 31 als 5,6,7,3',4'-substituiertes Flavon	132
8.4.3.	Identifizierung von 13 (Cirsimaritin)	133
8.5.	Isolierung von 32 und 33	133

8.5.1.	Identifizierung von 32 (Hispidulin)	134
8.5.2.	Identifizierung von 33 (Jaceosidin)	138
8.6.	Nachweis von 34 (Eupafolin)	143
8.7.	Isolierung von 35 und 36	143
8.7.1.	Identifizierung von 35 (6-OMe-Kämpferol)	144
8.7.2.	Identifizierung von 36 (Spinacetin)	148
8.8.	Identifizierung von 14 (Quercetin) und 15 (Kämpferol)	152
9.	KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER IDENTIFIZIERTEN INHALTSSTOFFE VON A. NEVADENSIS A. GRAY	153
10.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	154
11.	ZUSAMMENFASSUNG	161
12.	EXPERIMENTELLER TEIL	163
12.1.	Herkunft, Ernte, Trocknung und Lagerung des untersuchten Pflanzenmaterials	163
12.1.1.	Arnica viscosa A. Gray	163
12.1.2.	Arnica nevadensis A. Gray	163
12.2.	Spektroskopische Methoden	163
12.3.	Bestimmung der physikalischen Konstanten	164
12.4.	Chromatographische Methoden	165
12.4.1.	Dünnschichtchromatographie	165
12.4.2.	Aufarbeitung der Substanzen nach präparativer DC	167
12.4.3.	Säulenchromatographie	167
12.4.3.1.	Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie	168
12.4.3.2.	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	168
12.4.4.	Gaschromatographie	168
12.5.	Synthese der Thymolester	169
12.5.1.	Darstellung der Säurechloride	169
12.5.2.	Darstellung der Thymolester	169
12.5.3.	Synthese des Thymolmethylethers	170
12.6.	Derivatisierungen	170
12.6.1.	Darstellung des Acetates von 12	170
12.6.2.	Darstellung von 2-O-Acetyl-ivalin	170
12.7.	Extraktion und Aufarbeitung des Krautes von Arnica viscosa	171
12.7.1.	Gewinnung der Sesquiterpenlacton- und Flavonoid-Fraktion	171

12.8.	Fraktionierung der S1-Fraktion	172
12.8.1.	Isolierung und analytische Daten von 1	172
12.8.2.	Isolierung und analytische Daten von 2	173
12.8.3.	Isolierung und analytische Daten von 3	174
12.8.4.	Identifizierung und analytische Daten von 4 und 5	174
12.9.	Fraktionierung der F1-Fraktion	175
12.9.1.	Isolierung und analytische Daten von 6	176
12.9.2.	Isolierung und analytische Daten von 7	177
12.9.3.	Isolierung und analytische Daten von 8	177
12.9.4.	Isolierung und analytische Daten von 9 und 10	178
12.9.5.	Isolierung und analytische Daten von 11 und 12	180
12.9.6.	Analytische Daten des Diacetats von 12	181
12.9.7.	Isolierung und analytische Daten von 13	181
12.10.	Extraktion und Aufarbeitung der Blüten von A. viscosa	182
12.10.1.	Gewinnung der Sesquiterpenlacton- und Flavonoid-Fraktion	182
12.10.2.	Fraktionierung der S1-Fraktion	183
12.10.3.	Fraktionierung der F1-Fraktion	184
12.10.4.	Isolierung und analytische Daten von 14	184
12.10.5.	Isolierung und analytische Daten von 15	185
12.11.	Gehaltsbestimmung des ätherischen Öles der Rhizome, Blätter und Blüten von Arnica viscosa	186
12.12.	Inhaltsstoffe der ätherischen Öle von A. viscosa	187
12.12.1.	Identifizierung und analytische Daten von 16-22	187
12.12.2.	Isolierung und analytische Daten von 23	189
12.12.3.	Identifizierung von 24 und 25	190
12.13.	Extraktion und Aufarbeitung der Blätter von Arnica nevadensis	191
12.13.1.	Gewinnung der Sesquiterpenlacton- und Flavonoid-Fraktion	191
12.14.	Fraktionierung der S1-Fraktionen	192
12.14.1.	Isolierung und analytische Daten von 26	193
12.14.2.	Isolierung und analytische Daten von 27	194

12.14.3. Isolierung und analytische Daten von 28 195
12.14.4. Isolierung und analytische Daten von 29 196
12.15. Isolierung von 13, 30 und 31 197
12.15.1. Analytische Daten von 30 198
12.15.2. Analytische Daten von 31 198
12.16. Isolierung von 32 und 33 198
12.16.1. Analytische Daten von 32 199
12.16.2. Analytische Daten von 33 199
12.17. Nachweis von 34 200
12.18. Isolierung von 35 und 36 200
12.18.1. Analytische Daten von 35 200
12.18.2. Analytische Daten von 36 200

13. LITERATURVERZEICHNIS 201

UNIV. LEIDEN BIBL.

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die chemische Analyse der Inhaltsstoffe von Arnica-Arten ist sowohl von chemotaxonomischem als auch von pharmazeutischem Interesse. Unter den beschriebenen Arten der Gattung Arnica besitzt die europäische Arnica montana eine besondere Bedeutung als Stammpflanze für die in den Arzneibüchern vieler Länder geführte Droge "Flores Arnicae" [1]. Die gefährdete und deshalb durch Naturschutzgesetze besonders geschützte A. montana entzieht sich bisher einem feldmäßigen Anbau [2,3,4], so daß bereits seit längerem Engpässe in der Versorgung mit A. montana-Blüten bestehen [5] und deshalb seit Jahren nach einer gleichwertigen Austauschdroge innerhalb der Gattung Arnica gesucht wird.

In den USA wurden die Blüten von A. fulgens, A. sororia und A. cordifolia als Austauschdrogen in das National Formulary VIII (1946) [6] aufgenommen. Die problemlos kultivierbare nordamerikanische Wiesenarnika A. chamissonis [7,8,9] ist im 2. AB-DDR (1966) und in der Ph. UdSSR (1961) neben A. montana als gleichwertige Stammpflanze für die offizinellen Arnikablüten zugelassen worden. Sie wurde auch für das DAB 9 vorgeschlagen [5,10]. In der Volksmedizin wurden darüber hinaus weitere Arnica-Arten in gleicher Weise wie A. montana verwendet [11]. Die phytochemische Bearbeitung der gesamten Gattung ist deshalb wünschenswert.

Die Gattung Arnica umfaßt 32 definierte Species [12], von denen die meisten in Nordamerika heimisch sind. Von Maguire [12] werden sie nach anatomisch-morphologischen Kriterien zu fünf Subgenera zusammengefaßt: Artica, Austromontana, Chamissonis, Montana und Andropurpurea (s. Tab. 1).

Die Stellung der Gattung Arnica innerhalb der Familie der Asteraceae ist bis heute umstritten. Nach jahrelanger Zuordnung zur Tribus Senecioneae [13,14] erfolgte 1977 durch Nordenstam [15] die bereits mehrfach vorgeschlagene Ausglie-

Tab. 1: Die Gliederung der Gattung Arnica nach Maguire [12]

I. Subgenus ARTICA	II. Subgenus AUSTROMONTANA	III. Subgenus CHAMISSONIS
A. alpina	Section Eulatifolia	Section Euchamissonis
A. louisiana	A. latifolia	A. chamissonis
A. rhydbergii	A. gracilis	Section Eulongifolia
A. plantaginea	A. tomentella	A. longifolia
A. fulgens	A. cernua	Section Eumollis
A. sororia	*A. nevadensis	A. amplexicaulis
A. lonchophylla	A. paniculata	A. lanceolata
	A. cordifolia	A. diversifolia
	Section Eradiata	A. mollis
	A. grayi	A. parryi
	A. parviflora	IV. Subgenus MONTANA
	A. discoidea	A. acaulis
	A. spathulata	A. montana
	A. venosa	V. Subgenus ANDROPURPUREA
	*A. viscosa	A. lessingii
		A. unalaschcensis
		A. sachalinensis

derung [16-19] und die Eingliederung in die Tribus Heliantheae, die sich auf morphologische und chemische Merkmale gründete. In einer 1981 veröffentlichten Tribus-Neugliederung von Robinson [20] ist die Gattung Arnica ebenfalls in die Heliantheae (Subtribus Chaenactidinae) integriert. Doch auch diese Einordnung ist umstritten [21], so daß auch die Errichtung einer neuen Tribus "Arniceae" diskutiert wird [15]. Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen, ob diese derzei-

tige systematische Einordnung beibehalten werden kann, wobei die gebildeten Sekundärstoffe als eine zusätzliche Merkmalsquelle dienen können [20,22].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Arnica-Arten A. viscosa und A. nevadensis gehören nach Maguire [12] zur Untergattung Austromontana und hier zur Sektion Eradiata bzw. Sulatifolia (s. Tab. 1). Straley befürwortet in seiner 1980 erschienenen Arbeit [23] diese Einteilung von Maguire, gliedert jedoch A. viscosa zusammen mit der eng verwandten A. venosa aus und nimmt beide in den neu geschaffenen Subgenus Calarnica auf. Wolf und Denford [24] andererseits lehnen in ihrer Revision des Subgenus Austromontana sowohl die Sektioneneinteilung von Maguire als auch die neue Untergattung Calarnica ab, da sie innerhalb des Subgenus keine infraspezifischen Merkmale erkennen können.

Bei Arnica viscosa A. Gray (s. Abb. 1) handelt es sich um eine sehr seltene Species, von der nur sieben Standorte bekannt sind, da ihr Vorkommen auf Erde vulkanischen Ursprungs beschränkt ist [24,25]. In Anpassung an die extremen Lebensbedingungen an sehr steilen, felsigen Böschungen bildet sie ein holziges Rhizom- und Wurzelsystem aus. Die 20-50 cm hohen und 3-5 mm starken Stengel sind auffallend gestreift und manchmal mehrfach verzweigt, so daß A. viscosa ein buschiges Erscheinungsbild bietet. Sie besitzt zahlreiche kleine, ungestielte Blätter und als einzige Arnica-Art keine gelben, sondern 10-20 cremefarbene Blütenköpfchen, die aus 10-30 Röhrenblüten mit jeweils weißem, seltener gelbbraunem Pappus bestehen. Die ganze Pflanze ist so dicht mit langen Drüsenhaaren bedeckt, daß sie sich bei Berührung schleimig bzw. klebrig anfühlt.

Abb. 1: Arnica viscosa am natürlichen Standort

Arnica nevadensis A. Gray (Abb. 2) ist ebenfalls eine in ungewöhnlich großen Höhen anzutreffende Species, deren natürliche Wuchsorte auf die Gebirge der Westküste der USA beschränkt sind [24,26]. Die 1,5-2,5 mm starken, unverzweigten Stengel besitzen 2-3 Paar cauliflore, oval bis elliptische Blätter. Stengel und Blätter sind mit kurzen Drüsenhaaren besetzt. Die Pflanze besitzt entweder ein einziges Pseudanthium oder einen Blütenstand mit drei Blütenköpfchen, die an 4-15 cm langen Blütenstengeln sitzen. Die einzelnen Blütenköpfchen sind rund bis glockenförmig und bestehen aus 6-14 gelben Strahlen- und 20-60 Röhrenblüten, die ebenfalls drüsig behaart sind. Der Pappus der Einzelblüten ist weiß bis gelbbraun.

Abb. 2: Arnica nevadensis am natürlichen Standort

Charakteristische und chemotaxonomisch wertvolle Sekundärstoffe der Asteraceen sind die Sesquiterpenlactone (Sl) [20,22,27]. Sie werden überdies auch als wesentliche Wirkstoffe der A. montana-Blüten angesehen [1,28-31]. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die 37 bisher in Arten der Gattung Arnica identifizierten Sl. Abbildung 3 zeigt die Strukturen einiger dieser Verbindungen, mit denen gleichzeitig die bisher gefundene Variabilität in den Grundstrukturen wiedergegeben ist. Es handelt sich vor allem um Pseudoguaianolide vom 7β,8β-Helenanolid-Typ. Des weiteren wurde mit Ivalin ein erstes Eudesmanolid gefunden und aus der Gruppe der Xanthanolide die Verbindungen Carabron und Xanthalongin. In einer weiteren analysierten Arrica-Art, Arnica sachalinensis, konnten keine Sl nachgewiesen werden, was wahrscheinlich auf das Fehlen von Drüsenhaaren zurückzuführen ist [33], die

	A. mont.	A. cham. ssp. cham.	A. cham. ssp. foliosa	A. cham. ssp. incana	A. longifolia
Helenalin (H)	[30]	[40]	[42]	[42]	[45]
H-ival	[30]	--	[42]	--	--
H-2-mebut	[30]	--	[42]	--	--
H-tig	[30]	[40]	[42]	[42]	--
H-ang	--	--	[42]	--	--
H-ibu	[30]	--	--	--	--
H-mac	[29,30]	--	--	--	--
H-ac	[28-30]	--	--	--	[46]
11α,13-Dihydro-helenalin (DH)	[30,36]	[32]	[42]	[42]	--
DH-ival	[30,36]	--	[42]	[42]	--
DH-2-mebut	--	--	[42]	[42]	--
DH-tig	[30]	--	[42]	[42]	--
DH-ang	--	--	[42]	[42]	--
DH-ibu	[30,36]	--	[42]	[42]	--
DH-mac	[30,36]	--	--	--	--
DH-pro	--	--	[43]	[43]	--
DH-ac	[28,30,36]	--	[42]	[42]	[46]
11β,13-DH-ival (Mexicanin C-ival)	[42,103]	--	--	--	--
2,3,11α,13-Tetra-hydrohelenalin (TH)	[36]	--	--	--	--
TH-ibu	[37]	--	--	--	--
2β-Ethoxy-2,3-DH-ibu	[37]	--	--	--	--
Arnifolin	[38]	--	[38,42]	[42]	--
Arnifolin B	--	--	[42]	--	--
11α,13-Dihydro-arnifolin C	--	--	[42]	--	--
Flexuosin B	--	--	[42]	--	--
Chamissonolid (CH)	--	[41]	[42]	[42]	--
CH-6-ac	--	--	[42]	[42]	--
CH-4,6-ac	--	--	[42]	[42]	--
2-Desac-CH	--	[32]	[42]	[42]	--
6-Desoxy-CH	--	[41]	--	--	--
6-Desoxy-CH-ac	--	[32]	[43]	[43]	--
6-Desoxy-CH-ival*	--	--	[42]	--	--
11,13-Dihydro-6-desoxy-CH-ival*	--	--	[42]	--	--
2-Desac-6-desoxy-CH (Neopulchellin)	--	[32]	--	--	--
Carabron	--	--	[44]**	--	[45]
Xanthalongin	--	--	--	--	[46]
Ivalin	--	[39]	--	--	--

* Struktur nicht vollständig geklärt

** Vorkommen unsicher [42]

Tab. 2: Bisher in Arnica-Arten identifizierte Sesquiterpenlactone, in Klammern Literaturangaben (Abkürzungen der Säurereste nach [27])

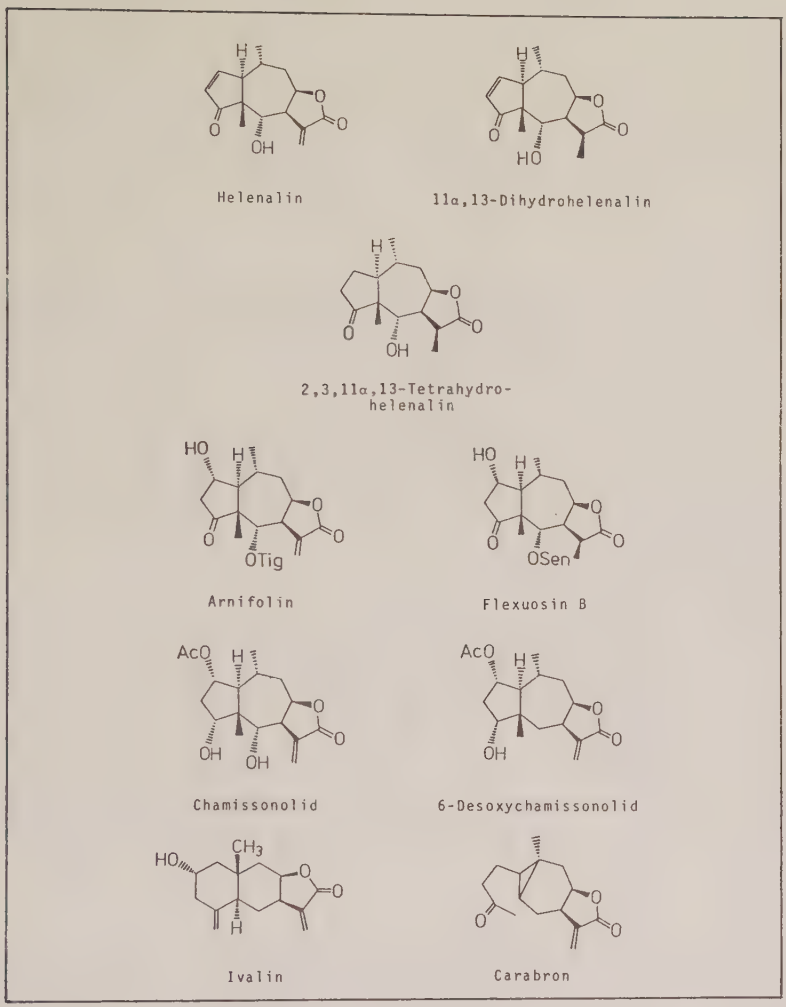
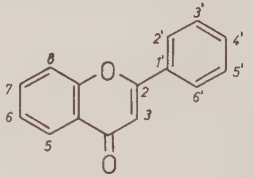


Abb. 3: Strukturformeln von in Arnica-Arten vorkommenden Sesquiterpenlactonen

in der Literatur als Akkumulationsorte der SL bei Asteraceen diskutiert werden [16,34,35].

Tab. 3: Bisher in Arnica-Arten nachgewiesene Flavonoid-Aglyka mit Literaturangaben (Abkürzungen der Substitutionsmusterangaben nach [63]; das Flavon-Grundgerüst mit der gültigen Bezifferung der Kohlenstoffatome ist der Tabelle vorangestellt):



Flavonoid (Trivialname) (Substitutionsmuster bezogen auf Flavon)	A. mont.	A. cham. ssp. cham.	A. cham. ssp. foliosa	A. cham. ssp. incana	A. longifolia
Apigenin (5,7,4'-OH)	[61]	[61]	[59,62]	[61]	[62]
Acacetin (5,7-OH,4'-OMe)	--	[61]	[62]	[60]	--
Hispidulin (5,7,4'-OH,6-OMe)	[60]	[61]	[62]	[60]	[62]
Pectolinarigenin (5,7-OH,6,4'-OMe)	[28,60]	[61]	[62]	[60]	--
Luteolin (5,7,3',4'-OH)*	--	[2,56,61,64]	[2,59,62]	[61]	[62]
Chrysoeriol (5,7,4'-OH,3'-OMe)	[61]	[61]	[62]	--	[62]
Diosmetin (5,7,3'-OH,4'-OMe)	--	--	--	[61]	--
Eupafolin (5,7,3',4'-OH,6-OMe)	[61]	[61]	[62]	[62]	[62]
Jaceosidin (5,7,4'-OH,6,3'-OMe)	[60]	[61]	[62]	[60]	[62]

Tricin (5,7,4'-OH,3',5'-OMe)	[62]	--	--	--	--
Kämpferol (3,5,7,4'-OH)	[55,61]	[61]	[59,62]	[61]	[62]
Kämpferid (3,5,7-OH,4'-OMe)	--	[62]	[62]	--	--
6-OMe-Kämpferol (3,5,7,4'-OH,6-OMe)	[60]	[61]	[62]	[60]	--
Betuletol (3,5,7-OH,6,4'-OMe)	[60]	[61]	[62]	[60]	--
Quercetin (3,5,7,3',4'-OH)	[55,61]	[61]	[59,62]	[61]	[62]
Isorhamnetin (3,5,7,4'-OH,3'-OMe)	[55,61]	[61]	[62]	[61]	[62]
Dillenetin (3,5,7-OH,3',4'-OMe)	--	[61]	[62]	[61]	--
Patuletin (3,5,7,3',4'-OH,6-OMe)	[61]	[61]	[62]	[61]	[62]
Spinacetin (3,5,7,4'-OH,6,3'-OMe)	[61]	--	[62]	[61]	[62]
Laciniatin (3,5,7,3'-OH,6,4'-OMe)	[61]	--	--	[61]	--
3,5,7-OH,6,3',4'-OMe	[62]	[61]	[62]	[61]	--

* Ebenfalls Inhaltsstoff von A. sachalinensis A. Gray und A. whitneyi Fern. (= A. cordifolia Hook ssp. whitneyi (Fern.) Maguire) [56]

Tab. 3: Fortsetzung von Seite 8

Da sich die Flavonoide einzelner Familien, Gattungen oder Arten sehr häufig in der Substitution, im Substitutionsmuster und im Oxidationsgrad des Ringes C unterscheiden, kommt auch dieser Stoffgruppe eine gewisse chemotaxonomische Bedeutung zu [47]. Eine der ersten umfassenden Untersuchungen auf diesem Gebiet erfolgte 1963 von Erdtman in der Gattung Pinus [48]. Seither sind Flavonoide intensiv für chemotaxonomische Untersuchungen genutzt worden [u.a. 47,49-54].

Als Flavonoide der Gattung Arnica wurden bis vor kurzem außer Kämpferol, Quercetin, Isorhamnetin und Pectolinarigenin lediglich einige Glykoside beschrieben [55-59]. Durch neuere Untersuchungen von Merfort [60-62] an Blüten von A. montana, A. chamissonis und A. longifolia wurden die Kenntnisse über die nicht glykosidisch gebundenen Flavonoide wesentlich erweitert. Einen umfassenden Oberblick über die Flavonoidführung der bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit untersuchten Arnica-Arten gibt Tabelle 3.

Flavonoide werden neben den Sesquiterpenlactonen auch als Nebenwirkstoffe der Arnikablüten diskutiert [65,66]. Nach neueren Untersuchungen besitzen auch sie eine entzündungshemmende Wirkung [67]. Bisweilen wird auch eine Mitbeteiligung des ätherischen Öls an der Gesamtwirkung der Arnikablüten vermutet [1,65,66]. Die chemische Zusammensetzung des ätherischen Öls oder einzelner Komponenten des Öls der Blütenkörbchen, meistens jedoch nur der unterirdischen Organe, sind für A. montana, A. sachalinensis, A. longifolia [68-71], A. chamissonis [7,72-74] sowie A. mollis, A. amplexicaulis, A. parryi und A. alpina [73,76] beschrieben worden. Als charakteristische Komponenten treten hier Thymol und verschiedene Thymolderivate auf.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der Sesquiterpenlactone und der Flavonoidaglyka von Arnica viscosa und Arnica nevadensis, die, wie bereits ausgeführt, beide zum chemisch bisher nicht untersuchten Subgenus Austromontana gehören. Bei der stark drüsig behaarten A. viscosa sollte darüber hinaus die Gehaltsbestimmung und die Analyse der Zusammensetzung des ätherischen Öls in die Untersuchung mit einbezogen werden.

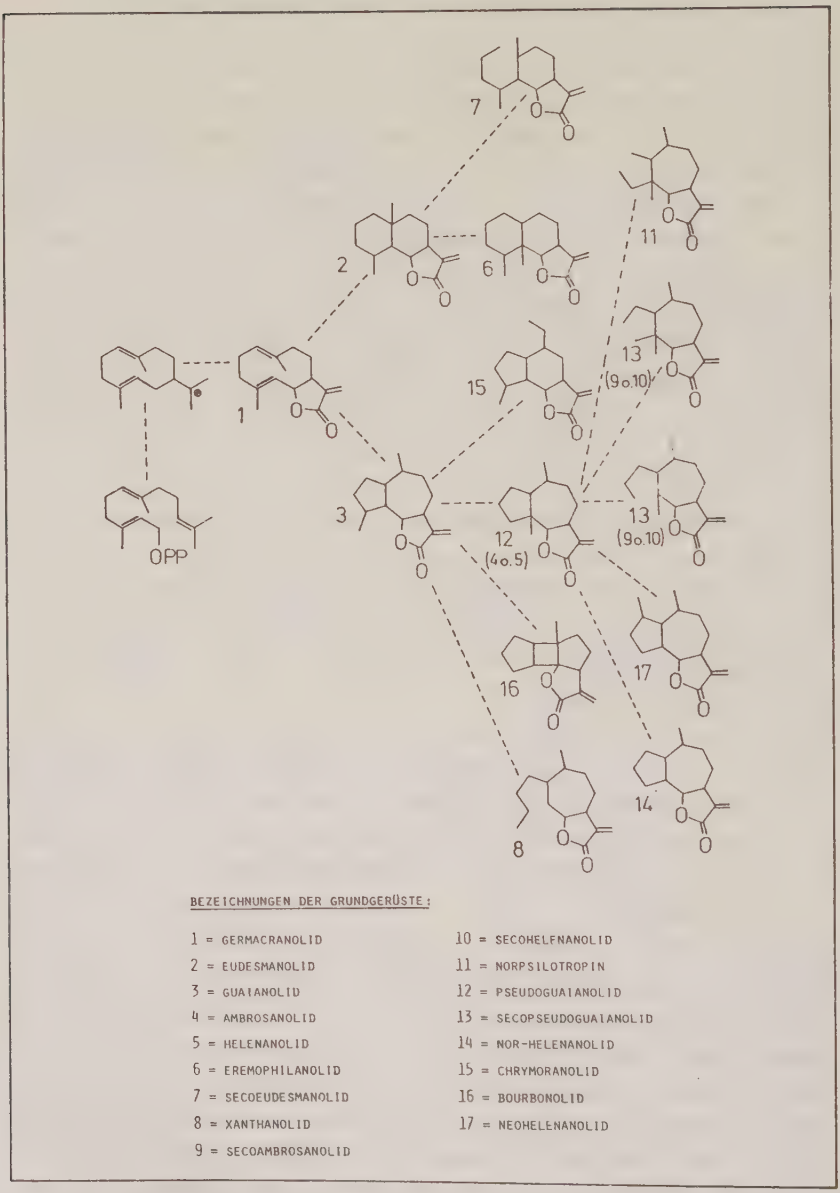
2. ZUR CHEMIE UND BIOSYNTHESE DER SESQUITERPENLACTONE

In der Familie der Asteraceen sind bis heute mehr als 1300 verschiedene Verbindungen aus der Stoffgruppe der Sesquiterpenlactone isoliert worden (siehe Obersichtsartikel [22,27]). Es sind farblose, amphiphile Verbindungen mit meist bitterem Geschmack, die vor allem in den Drüsenhaaren der oberirdischen Organe akkumuliert werden [16,34,35]. Biogenetisch leiten sie sich vom trans-Farnesylpyrophosphat ab, das vermutlich zu einem Germacradienylkation cyclisiert wird, aus dem durch anschließende Ringschlüsse, Ringspaltungen, Methylgruppenwanderungen und oxidative Veränderungen die verschiedenen Grundgerüste gebildet werden [22,27]. In Abbildung 4 ist die hypothetische Biosynthese einiger Asteraceen-Sesquiterpenlactone wiedergegeben.

Gemeinsames Strukturmerkmal dieser sich vom Germacran ableitenden Substanzen ist ein von C-7 nach C-6 oder C-8 geschlossener Lactonring (Nummerierung nach [27]), der an C-11, d.h. in α-Stellung zur C=O-Gruppe, eine Exomethylen- oder eine Methylgruppe trägt. In Asteraceen ist dieser Lactonring an C-7 stets β-orientiert.

Wie aus dem Biosyntheseschema in Abbildung 4 hervorgeht führt die Initialcyclisierung des Germacranolids bzw. dessen Vorstufe entweder zum Grundgerüst der Guaianolide oder der Eudesmanolide. Diese beiden Ringsysteme werden deshalb als Zwischenstufen der meisten anderen Sesquiterpenlacton-Grundgerüste angesehen.

In Abbildung 5 sind die gegenwärtig diskutierten Biosynthesewege der u.a. in der Gattung Arnica auftretenden Helenanolide und Xanthanolide wiedergegeben, die sich vom Germacrolid-4,5-epoxid [22] bzw. vom Melampolid-4,5-epoxid [77] ableiten und zunächst zu 1,5-cis- oder -trans-verknüpften Guaianoliden führen. Diese fungieren als Precursoren für die beiden als Ambrosanolide und Helenanolide bezeichneten Pseudoguaianolid-Untergruppen. Die Ambrosanolide besitzen eine β-ständige CH_3-Gruppe an C-10 und meist einen 7β,6β-cis-verknüpften γ-Lactonring, während bei den Helenanoliden die CH_3-Gruppe an C-10 stets α-konfiguriert ist und der Lactonring 7β,8β-cis- oder 7β,8α-



BEZEICHNUNGEN DER GRUNDGERÜSTE:

1 = GERMACRANOLID
2 = EUDESMANOLID
3 = GUAIANOLID
4 = AMBROSANOLID
5 = HELENANOLID
6 = EREMOPHILANOLID
7 = SECOEUDESMANOLID
8 = XANTHANOLID
9 = SECOAMBROSANOLID
10 = SECOHELENANOLID
11 = NORPSILOTROPIN
12 = PSEUDOGUAIANOLID
13 = SECOPSEUDOGUAIANOLID
14 = NOR-HELENANOLID
15 = CHRYMORANOLID
16 = BOURBONOLID
17 = NEOHELENANOLID

Abb. 4: Grundgerüste und hypothetische Biosynthese einiger vom Germacran abgeleiteter Asteraceen-Sl (als 7,6-Lactone; Ausschnitt aus [22])

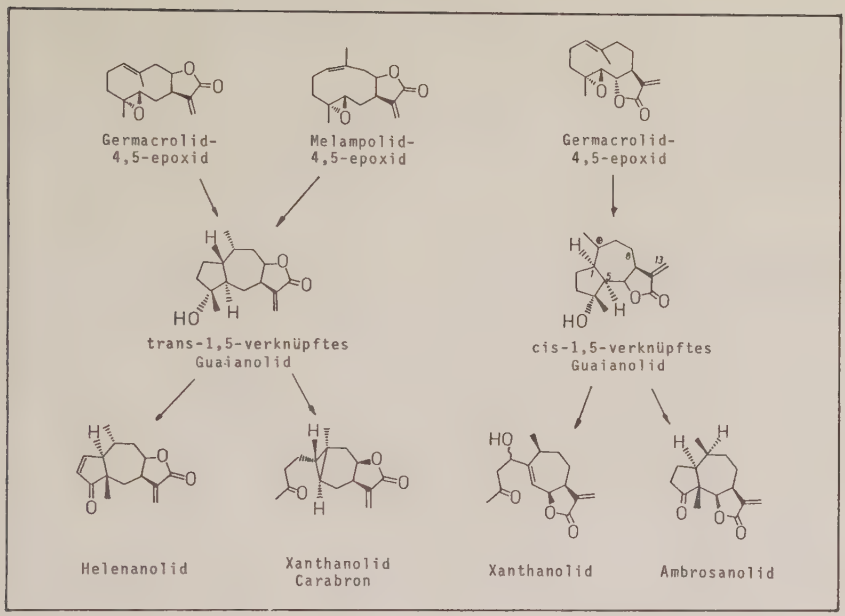


Abb. 5: Wahrscheinliche biogenetische Zusammenhänge von Guaianoliden, Pseudoguaianoliden und Xanthanoliden (nach [22])

trans-verknüpft ist. Ambrosanolide sind bisher hauptsächlich in der Subtribus Ambrosiinae der Heliantheae nachgewiesen worden, während Helenanolide außer in der "Problemgattung" Arnica auch in einigen Gattungen der Tribus Inulae und in den Subtriben Gaillardiinae und Ecliptinae der Heliantheae vorkommen [22,78,79].

Das aus Arnica chamissonis subsp. chamissonis isolierte Ivalin [40] gehört zu den Eudesmanoliden. Sie werden durch Cyclisierung eines Germacrolid-1,10-epoxids gebildet (s. Abb. 6). Obwohl verschiedene Populationen einer Species die Fähigkeit besitzen in einem Falle Eudesmanolide und im andern Falle Guaianolide oder Helenanolide zu bilden [22], scheint sich die Synthese beider Sl-Grundtypen innerhalb einer Sl-produzierenden Pflanze gegenseitig auszuschließen. Dennoch wird in der Literatur, z.B. für die Tribus Heliantheae, ver-

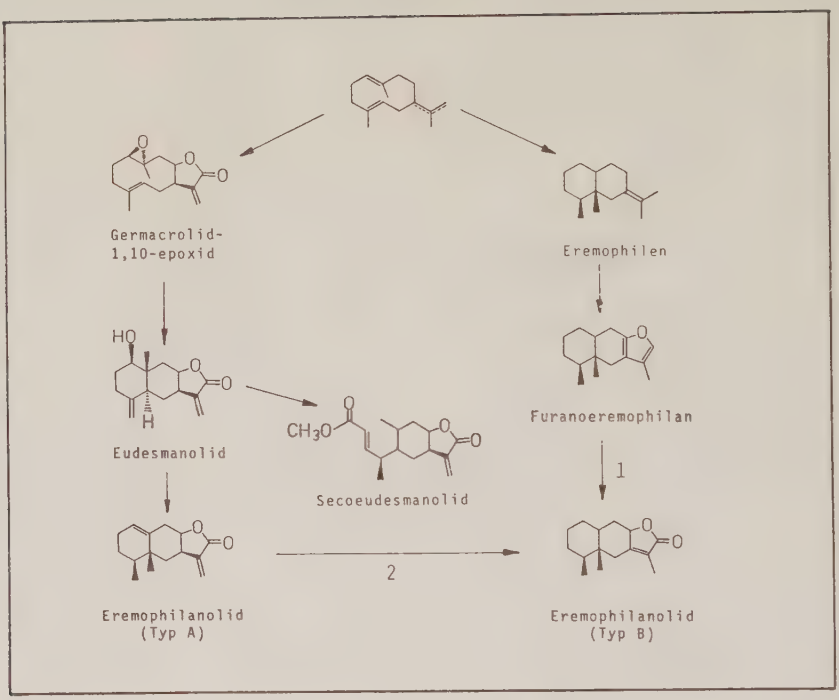


Abb. 6: Wahrscheinliche biogenetische Zusammenhänge die zu Eudesmanoliden und Eremophilanoliden führen (Ausschnitt aus [22])

einzelt vom gleichzeitigen Auftreten von Eudesmanoliden oder Eremophilanderivaten, die sich von Eudesman-Vorstufen ableiten, mit Guaianoliden (u.a. [80-83]) oder Helenanoliden [42,84] berichtet.

3. ZUR CHEMIE UND BIOSYNTHESE DER FLAVONOIDE

Flavonoide (2-Phenylchroman-Derivate) sind als wasserlösliche Glykoside oder lipophile freie Aglyka im Pflanzenreich weit verbreitet. Ihr Vorkommen ist nicht nur auf die Blüten beschränkt sondern dehnt sich auf alle Pflanzenteile aus.

Die gegenwärtig etwa 2000 bekannten Verbindungen dieser Stoffgruppe leiten sich von über 460 verschiedenen Aglyka ab (siehe Übersicht bei [63,85]). Mit dem Vorkommen von glykosidischen Hydroxyverbindungen im Zellsaft der Vakuolen kann in allen höheren Pflanzen gerechnet werden [86]. Nicht glykosidisch gebundene Hydroxyflavonoide findet man häufig im Kernholz von Holzgewächsen, während lipophile Flavonoide, die nur wenige freie OH-Gruppen besitzen und/oder mehrfach methoxyliert sind oder auch mit lipophilen Resten (Isoprenen) substituiert sind, oftmals in solchen Pflanzen anzutreffen sind, die auch sonst viele lipophile Stoffe (z.B. Terpene) synthetisieren. Sie werden dann zusammen mit diesen in typischen Exkretbehältern abgelagert.

Die Extraktion und der Isolierungsweg der Flavonoide richtet sich deshalb nach der Polarität des Flavonoidtyps, der isoliert werden soll. Über die bekannten Strukturtypen, das Vorkommen, die Isolierungsmöglichkeiten und die Identifizierung von Flavonoiden sind verschiedene Zusammenfassungen und Übersichtsartikel erschienen [87-94].

Wie Experimente mit radioaktiv markierten Vorstufen zeigten, leiten sich Flavonoide biogenetisch von der aktivierten Essigsäure und einer aromatischen Aminosäure ab. Ring A wird durch eine "Kopf-Schwanz-Kondensation" dreier Acetat-Einheiten (über Malonyl-CoA) aufgebaut, während z.B. Phenylalanin über das im Laufe der Biosynthese gebildete 4-Cumaroyl~SCoA, den Ring B und die Kohlenstoffe 2,3 und 4 des Heterocyclenringes C bildet [95,96]. Basierend auf Markierungs-Experimenten wurde die Ausbildung einer Polyketid-Zwischenstufe nach der Acetat-Regel [97,98] postuliert. Zentrale Zwischenstufe in der Biosynthese aller Flavonoide ist das Chalkon und das isomere Flavanon [95,96], wobei zuerst das Chalkon gebildet wird. Eine Chalkon-Isomerase katalysiert in einem zweiten

Schritt die stereospezifische Bildung des (-)(2S)-Flavanons vom korrespondierenden Chalkon [99], was durch NMR-Studien mit deuterierten Flavanonen belegt wurde [100]. Vom Chalkon/Flavanon leiten sich sämtliche anderen Flavonoide ab [87,88]. Da diese sehr häufig mit Flavonen und Flavonolen gemeinsam anzutreffen sind, scheinen ihre Biosynthesewege besonders nahe verwandt zu sein. Einige Biosyntheseschritte werden auch tatsächlich von den gleichen Enzymen katalysiert [95,96], weshalb oft identische Substitutionsmuster dieser Verbindungen in einer Pflanze oder in einzelnen Pflanzenorganen gefunden werden.

Bei in vivo-Experimenten wurde gezeigt, daß Chalkone mit einer Phloroglucin-Substitution im Ring A Intermediate der 5,7-OH-Flavonoide sind, während Chalkone mit Resorcin-Substitution im A-Ring zu 7-OH-Flavonoiden umgewandelt werden [95]. Der genaue Mechanismus durch den Flavanone in Flavone, Flavonole oder andere Flavonoide umgeformt werden, ist in den meisten Fällen noch nicht vollständig bekannt.

Die am häufigsten anzutreffende Strukturmodifikation der Flavonoid-Aglyka ist die Hydroxylierung der 3'-Position und spätere Methylierung der Hydroxygruppen in 3'- und 4'-Position des B-Ringes. Die Existenz von Flavonoid-spezifischen 3'-Hydroxylasen bzw. 3'- und 4'-O-Methyltransferasen in den verschiedensten Pflanzen lassen den Schluß zu, daß die Hydroxylierung an 3' und die Methylierung der Hydroxygruppen an 3' bzw. 4' nach der Ausbildung der Flavonoid-Grundstruktur erfolgt [101].

Aufgrund der Biosynthese besitzen die meisten Flavonoide im Ring A an C-5 und C-7 Hydroxygruppen. Manchmal findet jedoch eine weitere Hydroxylierung der 6- und/oder 8-Position statt. Obwohl in der Natur häufig Flavonoide mit Methoxysubstitution im Ring A gefunden werden [63,87,88], sind die enzymatischen Reaktionen, die zu Modifikationen führen, noch nicht ausreichend erforscht. Das gegenwärtige Interesse ist deswegen auch auf die Biosynthese von Flavonoiden gerichtet, die CH_3O-Gruppen an verschiedenen Positionen des A-Ringes (C-5, C-6, C-7, C-8) und an C-3 des Heterocyclenringes besitzen [101].

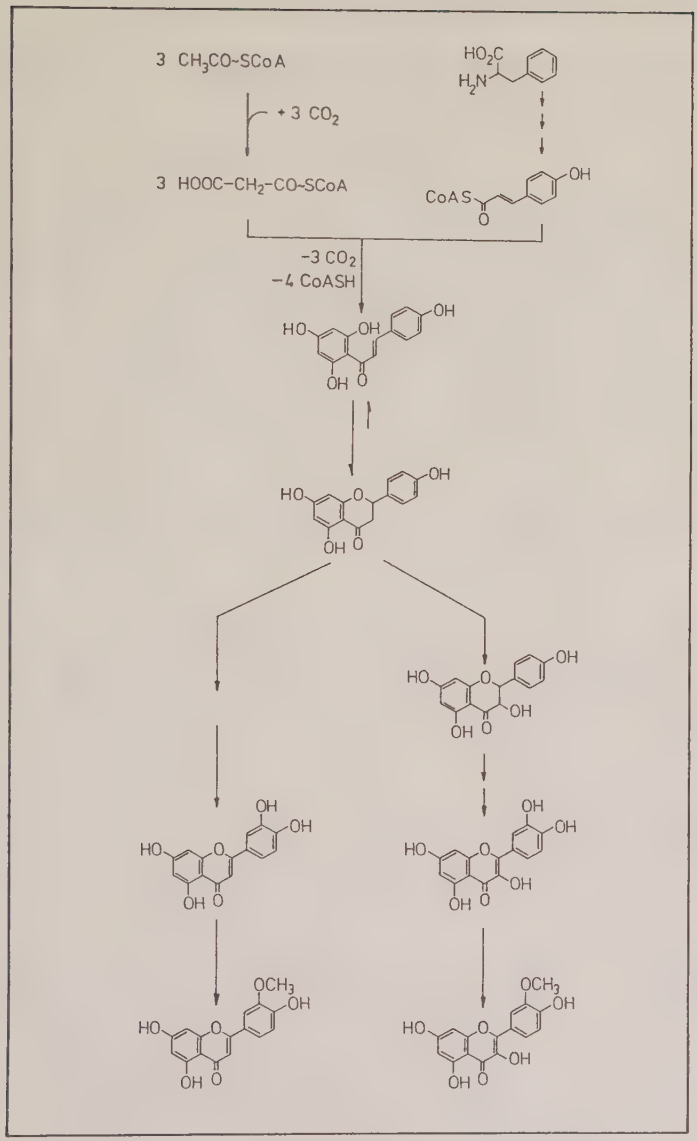


Abb. 7: Einer der möglichen Biosynthesewege methoxylierter Flavone bzw. Flavonole, wobei jeder Pfeil einem enzymatischen Schritt andeutet (abgewandelt nach [96])

4. ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER SESQUITERPENLACTONE UND FLAVONOIDE AUS DEM KRAUT VON ARNICA VISCOSA

4.1. Gewinnung der mit Sesquiterpenlactonen und Flavonoiden angereicherten Extrakte

Das getrocknete, gemahlene blühende Kraut von A. viscosa (1070 g) wurde mit Chloroform erschöpfend extrahiert, der Chloroformextrakt intensiv mit 60 %igem Ethanol ausgeschüttelt und die nach Abzug des Alkohols erhaltene wässrige Phase mit Chloroform ausgezogen (s. Kap. 12.7.). Der hiernach anfallende grüne, ölige Extrakt wurde über Sephadex LH 20 in vier Fraktionen (SX I bis SX IV) aufgetrennt. In Fraktion SX II fielen sämtliche Sl an und in Fraktion SX IV lagen die Flavonoide angereichert vor.

4.2. DC-Analyse und säulenchromatographische Auftrennung des Sl-Extraktes

Der DC-Vergleich mit Sl-Extrakten bekannter Zusammensetzung aus den Blüten von A. montana, A. chamissonis subsp. chamissonis und subsp. foliosa im System 2 unter Verwendung verschiedener Detektionsmittel ergab, daß in der Fraktion SX II nur zwei Sl in größerer Konzentration vorlagen, die in Laufhöhe und Anfärbung mit Dihydrohelenalin und 6-O-Acetyl-dihydrohelenalin übereinstimmten (s. Abb. 8). Sesquiterpenlactone vom Typ des Chamissonolids und 6-Desoxychamissonolids, wie sie in A. chamissonis gefunden wurden [41,42], ließen sich nicht nachweisen. Diese Verbindungen geben eine negative Zimmermann-Reaktion, lassen sich jedoch mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz als graubraune bzw. blauviolette Zonen detektieren. Mit dem zum Nachweis von Lactonen ebenfalls geeigneten Hydroxylamin/$FeCl_3$-Reagenz reagierten im Sl-Extrakt von A. viscosa nur die beiden mit Dihydrohelenalin und seinem Acetat übereinstimmenden Substanzzonen unter Braunfärbung.

Zur Isolierung der Sesquiterpenlactone wurde der Sl-Extrakt SX II an Kieselgel mit Petrolether (40-60°C)/Diethylether-

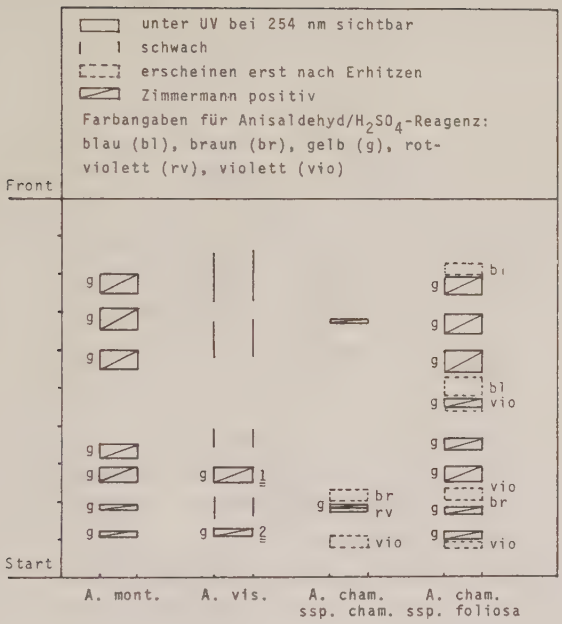
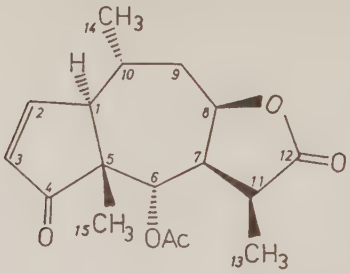


Abb. 8: DC des Sl-Extraktes aus dem Kraut von A. viscosa im Vergleich zu Sl-Extrakten aus anderen Arnica-Arten (DC-System 2)

Gemischen eluotrop aufgetrennt (s. Kap. 12.8.) und nach DC-Überprüfung in verschiedenen Fließmittelsystemen und Detektion mit unterschiedlichen Detektionsmitteln zu den Teilfraktionen S I bis S VII vereinigt.

Nach dieser sc Auftrennung wurden insgesamt fünf hydroxamat-positive Verbindungen, die gleichzeitig eine positive Zimmermann-Reaktion zeigten, dc nachgewiesen, die in den Teilfraktionen S III, S IV, S V bzw. S VI, z.T. isoliert vorlagen. Alle Fraktionen wurden unabhängig vom DC-Ergebnis auch einer sorgfältigen GC- bzw. GC/MS-Analyse unterzogen, wobei keine Hinweise auf weitere Sl-Verbindungen erhalten wurden.

4.2.1. Isolierung und Identifizierung von 1 (6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalin)



6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalin

In Teilfraktion S IV lag die Hauptkomponente des S1-Extraktes nahezu rein vor und kristallisierte nach Zugabe von Diethylether spontan aus. Nach mehrfachem Umkristallisieren konnte sie in Form weißer Kristalle (Ausbeute: 1,1 g = 0,1 % des Drogentrockengewichtes) gewonnen werden, die dc und gc in mehreren Systemen einheitlich waren. Laufhöhe und Retentionszeit entsprachen den Daten von 6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalin.

Das durch GC/MS-Kopplung aufgenommene Massenspektrum (Abb. 9) zeigt einen Molekülpeak bei m/z 306. Die Folgefragmente bei m/z 264 (M^+-42) und 246 (M^+-42-18) weisen zusammen mit dem Basispeak bei m/z 43 auf eine Acetylverbindung hin. Das übrige Fragmentierungsmuster entspricht dem eines 11α,13-Dihydrohelenalinesters [30,36,42,102].

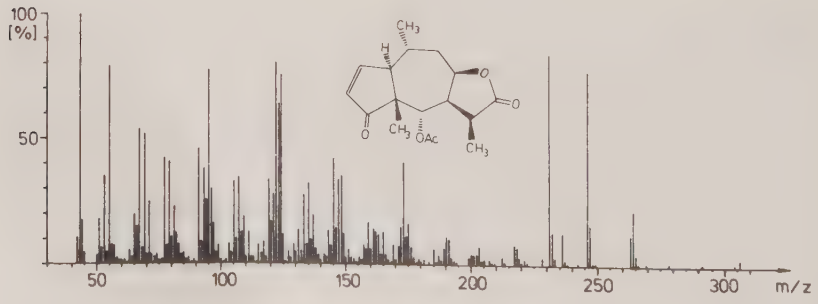


Abb. 9: Massenspektrum von 1

Im IR-Spektrum (Abb. 10) findet man bei 1735 cm^{-1} eine Absorptionsbande für eine Estergruppe und bei 1240 cm^{-1} eine intensive, allgemein für Acetylverbindungen typische Bande. Bei 1770 cm^{-1} liegt im C=O-Bereich die Bande eines γ-Lactons, während die dritte Absorptionsbande in diesem Bereich (1705 cm^{-1}) aus der C=O-Valenzschwingung eines Fünfring-Ketons in Konjugation zu einer Doppelbindung resultiert [103-106]. Für die Doppelbindung eines Cyclopentenonringes findet man ein weiteres Signal bei 1575 cm^{-1}. Da die Banden einer Exomethylengruppe im Spektrum nicht auftreten und auch die für α-Methylenbutyrolactone typische Bande zwischen 1650-1675 cm^{-1} [104,105] fehlt, kann 1 keine Exomethylengruppe am γ-Lactonring besitzen.

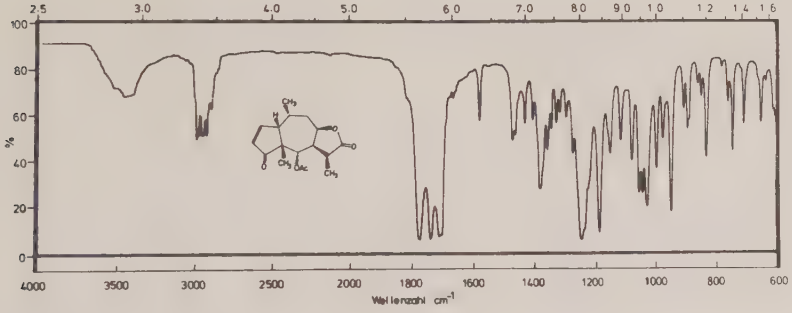


Abb. 10: IR-Spektrum von 1

Schmelzpunkt, UV-, MS- und IR-Daten (s. Kap. 12.8.1.) stimmen mit den für 6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalin (DH-ac) überein [28,36,107].

Zur endgültigen Absicherung wurde ein ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 11) aufgenommen, das in allen Signalen mit den Literaturwerten [36,103,107] für 6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalin identisch war. Die Zuordnung der Signale ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

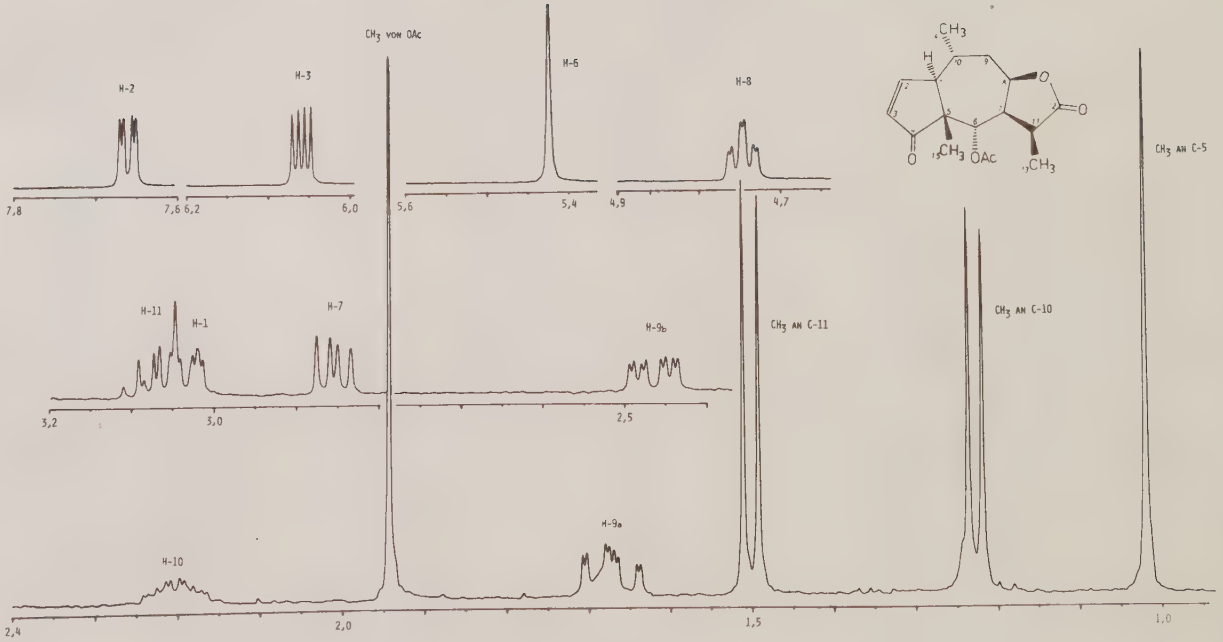


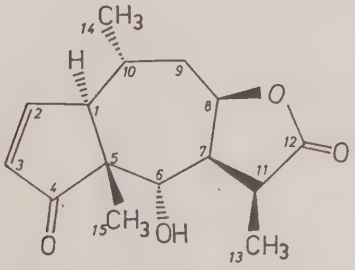
Abb. 11: ^{1}H-NMR-Spektrum von 1; δ (ppm); Bezeichnung a = α, b = β

Tab. 4: ^{1}H-NMR-Daten von 1 (6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalin); 400 MHz in $CDCl_3$, in Klammern Literaturwerte nach [36]

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
1	3.035 (3.03)	ddd	1,2	2.0 (1.5)
2	7.662 (7.65)	dd	1,3	3.0 (3.0)
3	6.063 (6.02)	dd	1,10	11 (9.5)
6	5.425 (5.42)	s(br)	2,3	6.0 (6.0)
7	2.855 (2.83)	dd(br)	6,7	<0.5 (- -)
8	4.745 (4.74)	ddd	7,8	6.5 (6.0)
9α	1.671 (--)	ddd	7,11	10.5 (10)
9β	2.464 (--)	ddd	8,9α	2.0 (2.0)
10	2.20 (--)	m	8,9β	6.0 (6.0)
11	3.07 (--)	dq	9α,9β	15.5 (14.5)
CH_3- an C-5	1.020 (0.99)	s	9α,10	11 (11)
CH_3- an C-10	1.227 (1,20)	d	9β,10	2.5 (<3)
CH_3- an C-11	1.503 (1.47)	d	10,14	6.8 (6.0)
CH_3- von OAc	1.943 (1.90)	s	11,13	7.5 (7.0)

6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalin (Arnicolid A) ist bereits in den Blüten und Blättern von Arnica montana [28,36,103] nachgewiesen worden. Es wird ebenfalls von A. longifolia [46] und A. chamissonis subsp. foliosa [42] gebildet.

4.2.2. Isolierung und Identifizierung von 2 (11α,13-Dihydrohelenalin)



11α,13-Dihydrohelenalin

Verbindung 2 konnte nach Zutropfen von Pentan aus der etherischen Lösung von Fraktion S VI auskristallisiert werden. Nach Umkristallisieren aus Diethylether lagen weiße Kristalle vor, bei denen es sich nach DC- und GC-Analyse um 11α,13-Dihydrohelenalin handeln sollte.

Das Massenspektrum (Abb. 12) zeigt den Molekülpeak bei m/z 264, der mit der Summenformel $C_{15}H_{20}O_4$ im Einklang steht. Auch das weitere Fragmentierungsmuster mit den Fragmenten m/z 124 (Basispeak), 123, 122, 96 und 95, die für ein Pseudoguaianolid mit Sauerstoffunktion an C-4, C-6 und C-8 sprechen [30,36,102], zeigt vollständige Übereinstimmung mit Dihydrohelenalin [32,42].

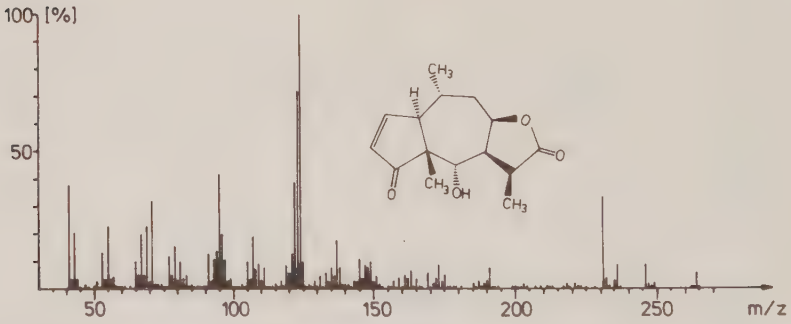


Abb. 12: Massenspektrum von 2

Im C=O-Bereich des IR-Spektrums (Abb. 13) treten die Banden eines γ-Lactons (1748 cm^{-1}) und eines Fünfring-Pentenons (1710 cm^{-1}) auf, dessen Doppelbindung eine Absorptionsbande bei 1575 cm^{-1} aufweist. Die Hydroxylgruppe erscheint als Bande bei 3490 cm^{-1}.

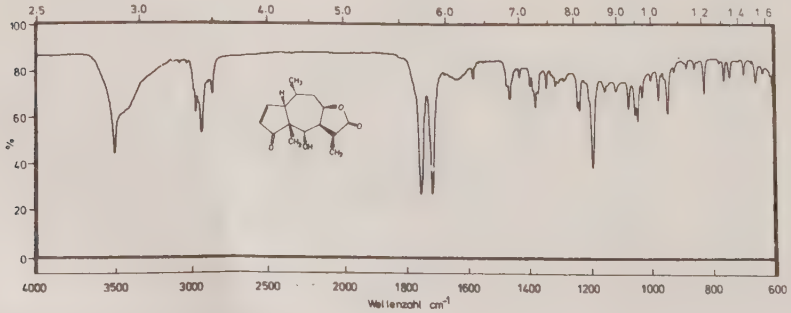


Abb. 13: IR-Spektrum von 2

Außer durch die MS- und IR-Daten wird die Identität von 2 mit Dihydrohelenalin auch durch den Schmelzpunktbereich, die UV-Daten (s. Kap. 12.8.2.) sowie die ^{1}H-NMR-Daten (Tab. 5, Abb. 14) bestätigt [32,36,42].

11α,13-Dihydrohelenalin (= Plenolin) wird somit außer von Arnica montana [30,36] und Arnica chamissonis subsp. chamissonis [32] sowie subsp. foliosa [42] auch von Arnica viscosa gebildet.

Tab. 5: ^{1}H-NMR-Daten von 2 (11α,13-Dihydrohelenalin); gemessen bei 400 MHz in $CDCl_3$, in Klammern Literaturwerte nach [36]

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
1	3.128 (3.14)	ddd	1,2	2.0 (2)
2	7.724 (7.71)	dd	1,3	3.0 (3.0)
3	6.082 (6.06)	dd	1,10	10.8 (10.5)
6	4.374 (4.37)	d(br)	2,3	6.0 (6.0)
7	2.978 (2.95)	dd(br)	6,7	<0.3 (- -)
8	4.793 (4.78)	ddd	6,-OH	4.2 (- -)
9α	1.749 (1.72)	ddd	7,8	6.0 (6.0)
9β	2.423 (2.41)	ddd	7,11	10 (- -)
10	2.18 (2.10)	m	8,9α	2.5 (2.5)
11	3.057 (3.04)	dq	8,9β	6.0 (6.0)
CH_3- an C-5	0.985 (0.98)	s	9α,9β	15.5 (15)
CH_3- an C-10	1.227 (1.21)	d	9α,10	10.5 (10)
CH_3- an C-11	1.368 (1.35)	d	9β,10	2.7 (- -)
OH- an C-6	2.138 (--)	d	10,14	7.0 (6.6)
			11,13	7.5 (7.0)

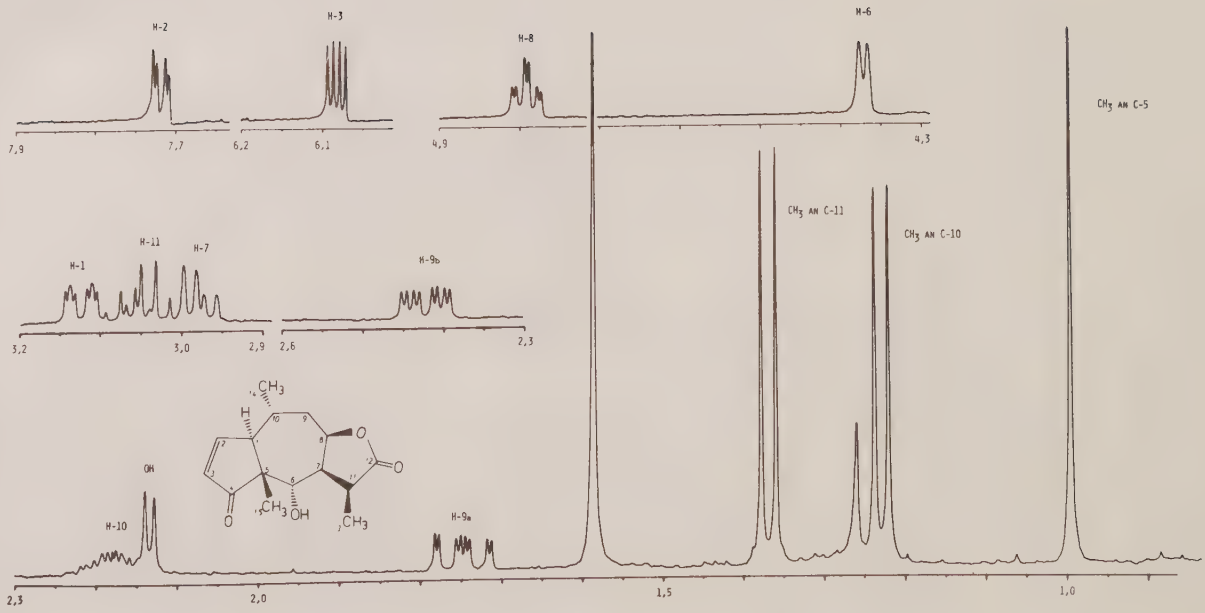
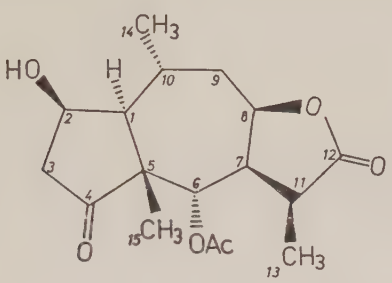


Abb. 14: ^{1}H-NMR-Spektrum von 2; δ (ppm); Bezeichnung a = α, b = β
Bei dem bei δ = 1.58 ppm liegenden Signal handelt es sich nicht um eine weitere Methylgruppe, sondern, wie schon des öfteren gefunden [42], um das Resonanzsignal für Kristallwasser; was hier jedoch nicht weiter geprüft wurde.

4.2.3. Isolierung und Strukturaufklärung von 3 (2β-Hydroxy-6-O-acetyl-2,3,11α,13-tetrahydrohelenalin)



2β-Hydroxy-6-O-acetyl-2,3,11α,13-tetrahydrohelenalin

In Fraktion S V war 3 neben Spuren von 4 relativ stark angereichert. Sie konnte aus einer Diethylether/Pentan-Lösung (9:1) in der Kälte auskristallisiert werden. Aufgrund der geringen Mengen (2,2 mg) wurde auf eine Umkristallisation verzichtet und die weißen, leicht grünlichen Kristalle nur mit kaltem Pentan gewaschen. Im DC war die isolierte Verbindung einheitlich. Sie lag in den Fließmittelsystemen 2 und 3 (R_f-Werte s. Kap. 12.8.3.) stets zwischen Helenalin und 11α,13-Dihydrohelenalin und zeigte gegenüber diesen keine Unterschiede im Detektionsverhalten. Im GC erschienen jedoch stets zwei Peaks mit unterschiedlicher Intensität.

Im Massenspektrum (Abb. 15) des Hauptpeaks (RT 13,3 Min., GC-System 1) findet man einen schwachen Peak bei m/z 324, der in Verbindung mit den ersten Folgefragmenten bei m/z 306 (M^+-18), 264 (M^+-18-42) und 246 (M^+-18-60) als Molekülpeak interpretiert werden kann. Diese Fragmente weisen gemeinsam mit dem Basispeak bei m/z 43 auf eine Verbindung mit einer freien OH- und einer Acetoxygruppe hin. Das Fragment bei m/z 306 besitzt die Masse von 6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalin, dessen Spaltprodukte darüber hinaus sämtlich im Spektrum erscheinen.

Das MS des zweiten Peaks (RT 11,0 Min., GC-System 1) zeigte überraschenderweise dasselbe Fragmentierungsmuster wie 6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalin (M^+ 306), mit dem es auch in der Retentionszeit übereinstimmte.

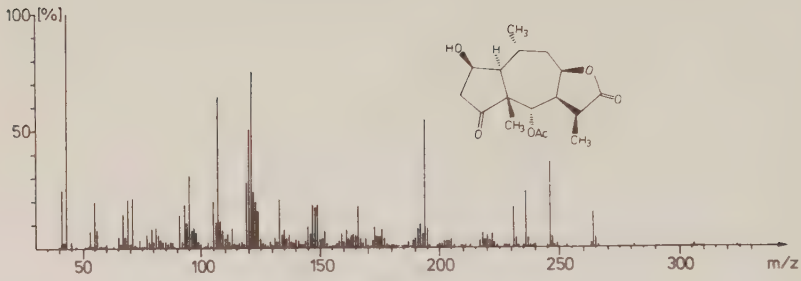


Abb. 15: Massenspektrum von 3

Wegen der Obereinstimmung in der MS-Fragmentierung mit dem Acetylderivat von 11α,13-Dihydrohelenalin und der Massendifferenz von 18 zwischen den beiden im GC erscheinenden Komponenten, die auf eine Abspaltung von Wasser aus der isolierten Verbindung hindeuteten, sollte es sich bei 3 um ein 2- oder 3-Hydroxy-Derivat des 6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalins handeln. Sterisch muß die OH-Gruppe jedoch so angeordnet sein, daß sie relativ leicht, evt. initiiert durch die Hitze des Einspritzblocks bei der GC-Analyse, eliminiert wird. Eine Eliminierung auf der Säule (OV 101) ist unwahrscheinlich, da ein "tailing" der Peaks nicht zu beobachten ist.

Im Einklang mit dieser Annahme finden sich im ^{1}H-NMR-Spektrum von 3 (Abb. 16 und 17, sowie Tab. 6) neben dem Singulett einer Acetoxy- und dem Singulett einer tertiären Methylgruppe (δ = 1.950 bzw. 1.160 ppm) die Dubletts zweier sekundärer Methylgruppen bei δ = 1.215 und 1.490 ppm.

Wie sich durch Einstrahlung zeigen läßt, ist der Kopplungspartner der im tieferen Feld in Resonanz tretenden Methylgruppe in dem Signal bei δ = 3.020 ppm zu suchen, das sich zu einem Dublett vereinfacht. Umgekehrt verändert sich bei Einstrahlung auf diese Frequenz das Dublett der sekundären Methylgruppe zu einem Singulett, aber gleichzeitig auch das bei δ = 2.763 ppm gelegene breite Ein-Protonen-Signal (dd --> d). Durch Einstrahlung auf die Resonanzfrequenz dieses Protons läßt sich ein weiterer Kopplungspartner bei δ = 4.707 ppm (ddd --> dd) ermitteln. Aufgrund der Tieffeldverschiebung und

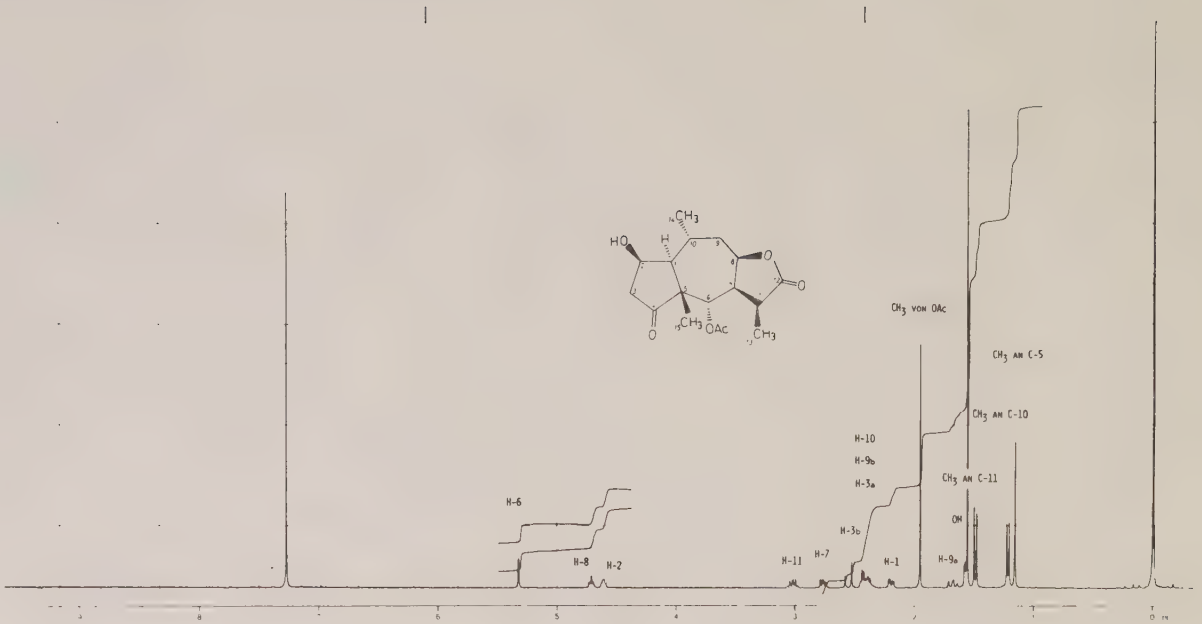


Abb. 16: ^{1}H-NMR-Spektrum von 3; Bezeichnung a = α, b = β
Bei dem bei δ = 1.58 ppm liegenden Signal handelt es sich nicht um weitere Methylgruppen, sondern, wie schon des öfteren gefunden [42], um das Resonanzsignal für Kristallwasser; was jedoch nicht weiter geprüft wurde.

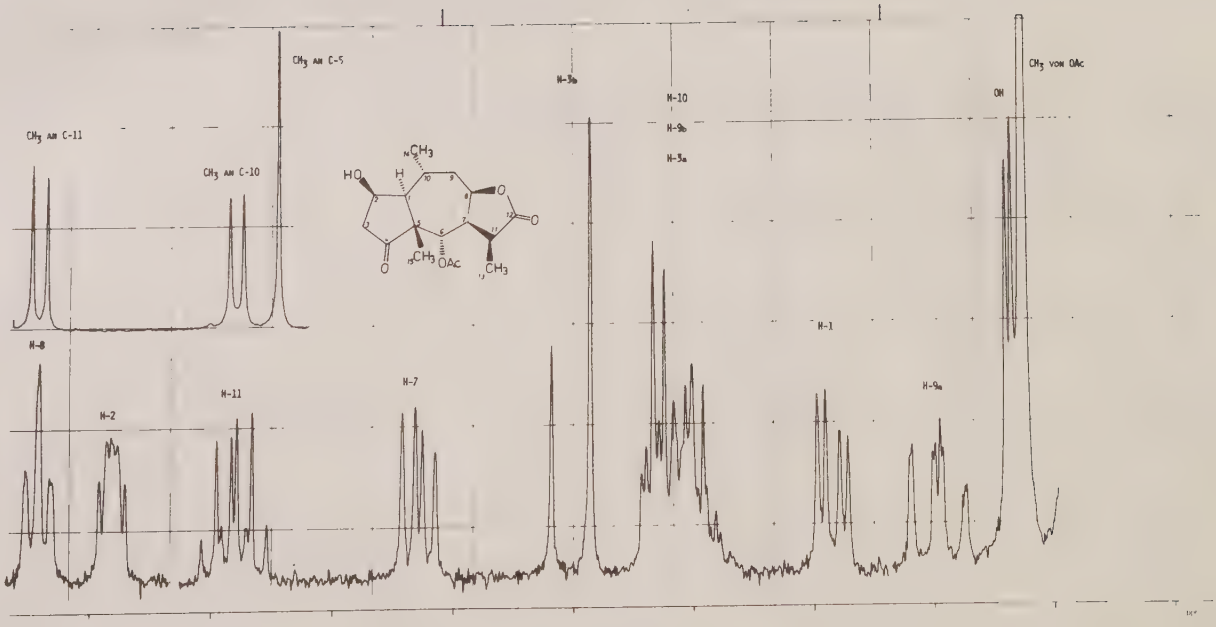


Abb. 17: Gespreizte ^{1}H-NMR-Signale von 3; Bezeichnung a = α, b = β

des Aufspaltungsmusters muß es sich hierbei um das Resonanzsignal von H-8 handeln, das am gleichen C-Atom lokalisiert ist wie der Sauerstoff des Lactonringes. Weiterhin zeigt der Kopplungspartner bei δ = 3.020 ppm jetzt das Aufspaltungsmuster eines Quartetts.

Aus diesen Entkopplungsexperimenten können folgende Schlüsse gezogen werden:

- Bei δ = 3.020 ppm liegt die Resonanzfrequenz von H-11. Aufgrund seiner Signalaufspaltung (dq) koppelt dieses Proton mit einer Methylgruppe (J_{11,CH_3} = 7.4 Hz), die bei δ = 1.490 ppm im Spektrum in Resonanz tritt. Ihre α-Stellung zur C=O-Gruppe des Lactonringes ergibt sich aus der relativ starken Tieffeldverschiebung des Signals.
- Ein anderer Kopplungspartner von H-11 ist H-7 (δ = 2.763 ppm, $J_{7,11}$ = 10,4 Hz), das seinerseits mit H-8 koppelt, woraus sich insgesamt das Vorliegen eines 7,8-verknüpften Lactonrings ergibt.

Weitere Kopplungspartner von H-8 sind die geminalen Protonen H-9α (ddd, δ = 1.675 ppm, ^2J = 15.5 Hz) und H-9β. Das Aufspaltungsmuster des zwischen 2.33 und 2.48 ppm liegenden Signals von H-9β ist wegen starker Oberlagerung nicht erkennbar. Im gleichen Bereich liegt das Signal von H-10. An C-10 muß auch die zweite sekundäre Methylgruppe lokalisiert sein, da nach Einstrahlung auf die Frequenz dieses Dubletts (δ = 1.215 ppm) das Signal von H-10 deutlich verändert wird.

Aufgrund seiner Tieffeldverschiebung muß das verbreiterte Singulett bei δ = 5.317 ppm (J <0.3 Hz) dem Proton zugeordnet werden, das am gleichen C-Atom steht wie die Acetoxygruppe. Die Signalaufspaltung ist, analog den ^{1}H-NMR-Daten des 6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalins (s. Abb. 11 und Tab. 4) erklärbar, wenn es sich hierbei um H-6 handelt, das als unmittelbaren Nachbarn neben H-7 das quartäre C-5 besitzt, das mit C-1, dem sp^2-hybridisierten C-4 (C=O) und der tertiären Methylgruppe (δ = 1.160 ppm) verknüpft ist. Die aus der Halbwertsbreite zu entnehmende sehr kleine Kopplungskonstante resultiert aus der Kopplung mit H-7 (s. auch Tab. 4, S. 23 und Abb. 11, S. 22).

Für das Hydroxyproton findet man im Spektrum ein Signal bei etwa 1.58 ppm. Die Signalaufspaltung (d) beweist, daß es sich um eine sekundäre OH-Gruppe handeln muß, deren Kopplungspartner im tieferen Feld zu suchen ist und in dem Resonanzsignal bei δ = 4.605 ppm vermutet wird. Einstrahlung auf dieses Signal vereinfacht sowohl das OH-Signal zu einem Singulett, als auch das Signal bei δ = 2.193 ppm (dd --> d). Gleichzeitig wird deutlich, daß ein weiterer Kopplungspartner in dem bereits von H-10 und H-9β überlagerten Bereich von 2.33 - 2.48 ppm liegen muß. Das nun klar erkennbare Dublett zeigt nur noch eine große geminale Kopplung (^2J = 19.3 Hz), die sich in dem Signal bei δ = 2.547 ppm wiederfindet.

Einstrahlung auf das Resonanzsignal bei δ = 2.193 ppm (dd) vereinfacht das Signal bei δ = 4.605 ppm zu einem breiten Dublett.

Aus diesen Entkopplungsexperimenten lassen sich die Signale problemlos den Cyclopentanonringprotonen zuordnen:

- Das bei δ = 4.605 ppm erscheinende Resonanzsignal muß dem Proton an C-2 zugeschrieben werden, an dem wegen der chemischen Verschiebung auch die OH-Gruppe lokalisiert sein muß. Das triplettähnliche Signal kann als Doppeldublett mit etwa gleich großen Kopplungskonstanten ($J_{1,2}$ = 4.2 Hz, $J_{2,3}$ = 5.7 Hz interpretiert werden. Ein Kopplungspartner dieses Protons ist H-1 (δ = 2.193 ppm) das seinerseits noch mit H-10 in Resonanz tritt ($J_{1,10}$ = 11 Hz).

Die chemische Verschiebung und die dem absoluten Betrag nach große geminale Kopplung von 19.3 Hz der Signale bei δ = 2.408 und 2.547 ppm ist typisch für geminale Protonen an einem sp^3-hybridisierten C-Atom in α-Stellung zu einem sp^2-hybridisierten C-Atom (Carbonylgruppe) [109,110], so daß diese Protonen an C-3 stehen müssen.

Somit besitzt 3 ein Pseudoguaianolidgerüst mit einem 7,8-verknüpften γ-Lactonring und einem Cyclopentanonring, der an C-2 eine Hydroxygruppe trägt.

Die ^{1}H-NMR-Daten (Tab. 6) sind insgesamt nur mit dem Vorliegen eines 7β,8β-cis-verknüpften Helenanolids vereinbar, wie dies

Tab. 6: ^{1}H-NMR-Daten von 3 (2β-Hydroxy-6-O-acetyl-2,3,11α,13-tetrahydrohelenalin); gemessen bei 360 MHz in $CDCl_3$

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
1	2.193	dd	1,2	4.2
2	4.605	dd(br)	1,10	11.0
3α	2.408	dd	2,OH	2.4
3β	2.547	d	2,3α	5.7
6	5.317	s(br)	2,3β	<0.5
7	2.763	dd(br)	3α,3β	19.3
8	4.707	ddd	6,7	<0.3
9α	1.675	ddd	7,8	6.5
9β	2.33-2.48	--*	7,11	10.4
10	2.33-2.48	--*	8,9α	1.1
11	3.020	dq	8,9β	6.0
CH_3- an C-5	1.160	s	9α,10	11.5
CH_3- an C-10	1.215	d	9β,10	--*
CH_3- an C-11	1.490	d	9α,9β	15.5
CH_3- von OAc	1.950	s	10,14	6.5
OH- an C-2	~1.58	d	11,13	7.4

* wegen Überlagerung nicht zu erkennen

bereits aus dem Vergleich mit den entsprechenden Daten für 1 hervorgeht (s. Tab. 4, S. 23).

Die 7,8-cis-verknüpften Pseudoguaianolide besitzen eine Kopplungskonstante von $J_{7,8} \leq 8$ Hz (3 = 6,5 Hz), während bei trans-verknüpftem Lactonring größere Kopplungskonstanten zu erwarten sind [79,111-115]. Die α-Orientierung der CH_3-Gruppe an C-10 und damit die Zugehörigkeit von 3 zu den Helenanoliden, ergibt sich aus der Größe der Kopplungskonstanten $J_{1,10}$ [79, 109,114-116], die bei 3 11 Hz beträgt. Bei Ambrosanoliden mit 10β-ständiger Methylgruppe ist die trans-diaxiale Stellung der Protonen H-1 und H-10 nicht gegeben und der $J_{1,10}$-Wert wesentlich kleiner [117].

Vergleicht man die ermittelten vicinalen Kopplungskonstanten der Cycloheptanprotonen mit dem Dreiding-Modell bzw. mit den

von Wiebke et al. [108, s. auch bei 42] ermittelten Daten zur Konformationsbestimmung des Siebenringes bei 7β,8β-cis-verknüpften Helenanoliden, so ergibt sich daraus für den Siebenring die Konformation eines verdrillten Sessels. Legt man diese Konformation zugrunde, dann muß die Acetoxygruppe an C-6 α- und der Wasserstoff β-konfiguriert sein. Nur bei dieser räumlichen Anordnung läßt sich ein Diederwinkel von etwa 90° einstellen, mit dem der sehr kleine $J_{6,7}$-Wert (<0.3 Hz) zu erklären ist.

In Übereinstimmung mit den bisher in der Gattung Arnica gefundenen 11α,13-Dihydrohelenalinderivaten und dem ermittelten $J_{7,11}$-Wert = 10.4 Hz, ist die Methylgruppe an C-11 β-konfiguriert. Im Falle einer α-Konfiguration würde, bei der zu fordernden Sesselkonfiguration, das β-ständige Proton H-7 mit H-11 einen Winkel von ca. 90° bilden und somit keine oder nur eine sehr kleine Kopplung zeigen.

Wegen der trans-Verknüpfung des Fünf- und Siebenringes bei Pseudoguaianoliden und der damit verbundenen eingeschränkten Flexibilität des Cyclopentanringes, ist die Bestimmung der räumlichen Anordnung der OH-Gruppe an C-2, entsprechend der Karplus-Conroy-Beziehung, über die vicinalen Kopplungskonstanten möglich. Das Aufspaltungsmuster von H-2 (dd(br)) ist nur erklärbar, wenn die Hydroxygruppe β-orientiert ist. Bei Modellbetrachtung findet man zwischen H-2α und H-3β einen Diederwinkel von etwa 90°, während die Winkel zwischen H-2α und H-1 sowie H-2α und H-3α annähernd gleich groß sind. Dies erklärt, warum H-3β nur als Dublett und H-2α als Doppeldublett mit nahezu gleich großen Kopplungskonstanten im Spektrum erscheinen. Ähnliche Signalaufspaltungen und Kopplungen sind auch bei den wenigen, bisher bekannten 4-Oxo-Pseudoguaianoliden mit 2β-Substitution gefunden worden [37,79,118,119]. Bei einer α-Substitution an C-2 wäre keine Kopplung mit <0.5 Hz möglich. H-2α und H-3β müßten dann komplizierter aufspalten, wie dies für 2α-substituierte 4-Oxo-Pseudoguaianolide auch gefunden worden ist (u.a. [42,120,121]).

Aufgrund der MS- und ^{1}H-NMR-Daten handelt es sich bei 3 um das 2β-Hydroxy-6-O-acetylderivat von 2,3,11α,13-Tetrahydrohelenalin, das bisher noch nicht beschrieben worden ist.

Von Kondo [118] und Dominguez [119] sind 2β-Methoxyderivate von 4-Oxo-Pseudoguaianoliden gefunden worden. Das aus Helenium autumnale isolierte 2β-Methoxy-2,3-dihydrohelenalin wird dabei von Kondo als Naturstoff bezeichnet. Seine Identifizierung erfolgte durch direkten Vergleich mit synthetisiertem Material, das durch Umsetzung von Helenalin mit methanolischer Salzsäure erhalten wurde [122]. Über die einzelnen Isolierungsschritte gibt die Arbeit keine Auskunft. Dominguez [119] hingegen erhielt den 2β-Methoxy-9β-hydroxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester durch Addition von Methanol an die konjugierte 2,3-Doppelbindung (Michael-Addition) während einer Verseifungsreaktion.

Das von Willuhn et al. [37] aus A. montana isolierte 2β-Ethoxy-6-O-isobutyryl-helenalin ist vermutlich bei der Aufarbeitung (in 60 %igem Ethanol) aus 6-O-Isobutyryl-helenalin hervorgegangen, da es bei der HPLC-Analyse der Gesamt-SL von A. montana-Blüten derselben Herkunft [123], bei der eine andere Extraktions- und Aufarbeitungsmethode gewählt wurde, nicht gefunden werden konnte.

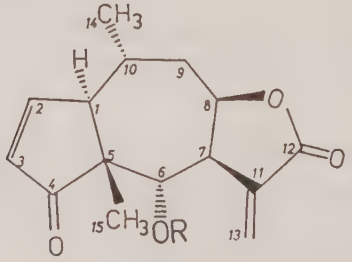
Als einziges 2β-Hydroxy-Derivat eines 4-Oxo-Pseudoguaianolids ist bisher nur 2β-Hydroxy-6-O-methacryloyl-helenalin beschrieben worden. Es wurde von Bohlmann [79] nach verschiedenen säulen- und dünnschichtchromatographischen Reinigungsschritten unter Verwendung von Diethylether, Petrolether und Methanol als Elutionsmittel durch HPLC-Fraktionierung an RP-8-Material mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (3:2) aus Monactis macbridei isoliert.

Interessanterweise sind alle erwähnten 2β-Derivate, wie auch das aus A. viscosa isolierte 2β-Hydroxy-6-O-acetyl-2,3,11α,13-tetrahydrohelenalin, Abkömmlinge des jeweiligen dominierenden Sesquiterpenlactons der aufgearbeiteten Pflanzen [37,79,118], die ausnahmslos alle einen Cyclopentenonring besitzen. Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß alle diese Verbindungen als Artefakte während der Aufarbeitung des Pflanzenmaterials entstanden sind. Allerdings sollten bei einer Ethanol-, Methanol- oder Wasseranlagerung alle in der Droge nachgewiesenen Pseudoguaianolide mit konjugierter 2,3-Doppelbindung umgesetzt werden. Da die Umsetzungsbedingungen für den Ablauf dieser Reak-

tion zweifellos nicht günstig sind - zufällig müßte ein saures oder alkalisches Milieu vorliegen - braucht die prozentuale Ausbeute der Additionsprodukte nicht sehr hoch zu sein und kann unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Dies würde erklären, warum stets nur die 2β-Derivate der Hauptkomponenten der Pflanzen gefunden wurden.

Gegen das Vorliegen von Artefakten bei den 2β-Hydroxy-Derivaten spricht das Nichtauffinden der entsprechenden 2β-Ethoxy- bzw. Methoxyverbindungen. Da die Alkoholate die besseren Nucleophile darstellen und im Falle des Hydroxyderivats die Rückreaktion zur α,β-ungesättigten Carbonylverbindung besonders bevorzugt ist, sollte neben der Cyclopentenonverbindung vor allem mit dem Auftreten der Ethoxy- bzw. Methoxyderivate gerechnet werden. Da diese jedoch nicht nachgewiesen werden konnten, scheint es sich bei den 2β-Hydroxyverbindungen tatsächlich, wie auch von Bohlmann vermutet [79], um biosynthetische Vorstufen des entsprechenden Sesquiterpenlactons mit einem Cyclopentenonring zu handeln. Somit ist 3 in A. viscosa vermutlich die Vorstufe des 6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalins (1).

4.2.4. Identifizierung von 4 und 5 (Helenalin und 6-O-Acetyl-helenalin)



4: R = H Helenalin
5: R = Ac 6-O-Acetyl-helenalin

Neben 1-3 führt Arnica viscosa in Spuren zwei weitere Sl, die in der Teilfraktion S V (4) bzw. S III (5) anfielen. Aufgrund der DC- und GC-Analyse handelt es sich bei ihnen um Helenalin

und dessen Essigsäureester. Auf ihre Reindarstellung wurde verzichtet. Ihre Identifizierung erfolgte durch direkten GC- und GC/MS-Vergleich mit den authentischen Verbindungen (MS-Daten s. Kap. 12.8.4.).

Beide Sesquiterpenlactone wurden bereits in A. montana [30] und in A. longifolia [45,46] nachgewiesen. Von Pretzsch [40] und Kresken [42] wurde Helenalin des weiteren in Arnica chamissonis subsp. chamissonis bzw. subsp. foliosa identifiziert.

4.3. DC-Analyse und säulenchromatographische Auftrennung des Flavonoid-Extraktes

Zur ersten Orientierung wurde die Fl-Gesamtfraktion SX IV im Vergleich zu bekannten Flavonoiden dc aufgetrennt (Abb. 18). Bereits nach Detektion mit Naturstoffreagenz A (NA) bzw. Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz konnten die als Vergleichssubstanzen gewählten Flavonoide Pectolinarigenin, Jaceosidin

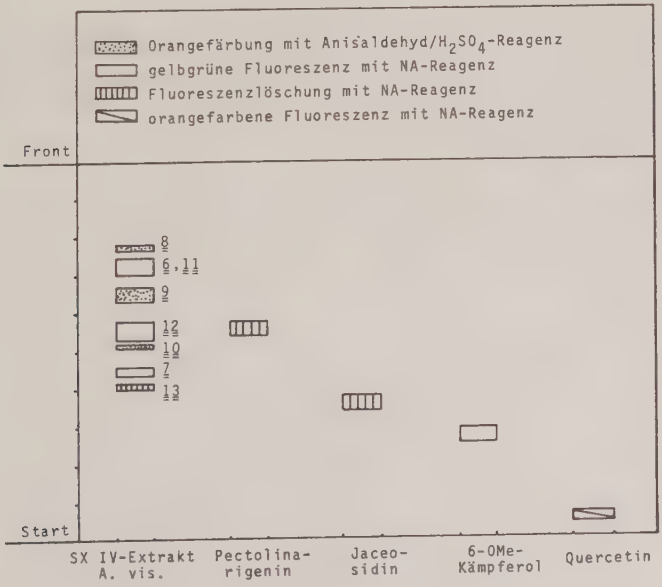


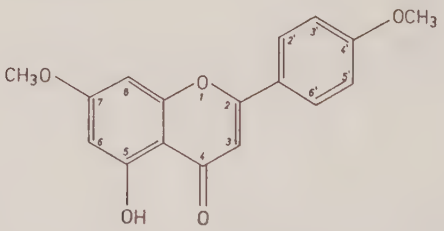
Abb. 18: DC des Fl-Extraktes aus dem Kraut von A. viscosa im Vergleich zu bekannten Flavonoiden (System 6)

und 6-OMe-Kämpferol als Inhaltsstoffe des Krautes von A. viscosa ausgeschlossen werden. Bei den dominierenden Flavonoiden handelt es sich um 7 bis 8 sehr lipophile Verbindungen, die sich nicht nur in der Laufhöhe, sondern auch im Fluoreszenz- bzw. Farbverhalten gegenüber den verwendeten Detektionsmitteln deutlich unterschieden. Bis auf die polarste Komponente zeigten in dem gewählten Konzentrationsbereich [124] sämtliche Flavonoide im UV-Licht (366 nm) eine mehr oder weniger kräftige gelbliche bis gelbe oder gelbgrüne Fluoreszenz. Nach Wollenweber [125] zeigen 6-OMe-Flavone keine Fluoreszenz, sondern geben sich im Chromatogramm durch Fluoreszenzlöschung zu erkennen. Neben den beiden Vergleichssubstanzen Pectolinarigenin und Jaceosidin zeigte nur eine Verbindung der Fl-Gesamtfraktion dieses typische Verhalten.

Nach Besprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz färbten sich drei Verbindungen orange und differenzierten sich so deutlich von den übrigen Flavonoiden, die nur die übliche Farbvertiefung von gelblich nach gelb zeigten.

Zur Isolierung der Flavonoide wurde die Fl-Gesamtfraktion an Kieselgel mit $CHCl_3$ bzw. $CHCl_3$/MeOH-Gemischen aufgetrennt und nach dc Überprüfung zu den Teilfraktionen SF I/1 bis SF I/7 vereinigt (s. Kap. 12.9.).

4.3.1. Isolierung und Identifizierung von 6 (Apigenin-7,4'-dimethylether)



Apigenin-7,4'-dimethylether

Verbindung 6 fiel in Fraktion SF I/3 als Hauptverbindung an, aus der sie aus Diethylether in langen, blaßgelben Nadeln

(Schmp. 168,5-170°C) auskristallisiert werden konnte. Die Substanz färbte sich mit NA-Reagenz gelb und zeigte im UV-Licht eine charakteristische hellgelbe bis grüngelbe Fluoreszenz. Bereits der R_f-Wert von 0,73 (System 6) und die gute Löslichkeit in Diethylether wiesen auf eine sehr lipophile Verbindung hin.

Abbildung 19 gibt die UV-Spektren unter Verwendung verschiedener Shift-Reagenzien wieder. Die Auswertung der Spektren erfolgte nach Standardverfahren [92,93].

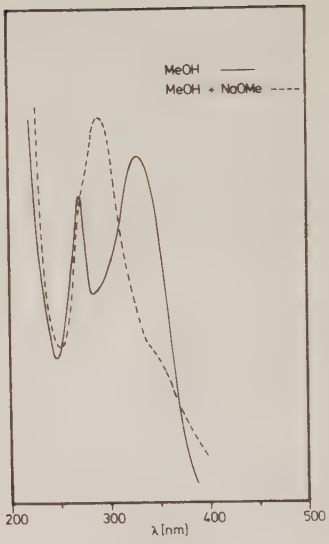
In methanolischer Lösung zeigte 6 eine für Flavone und 3-OMe-Flavonole typische Absorptionskurve mit einer Bande bei 327 nm (Bande I) und einem zweiten Maximum bei 269 nm (Bande II). Das Auftreten von nur einem Maximum bei 269 nm ließ auf einen monosubstituierten (4') B-Ring schließen, was durch die relativ kurzwellige Absorption der Bande I bestätigt wird, da mit steigendem Oxidationsgrad des B-Ringes das Maximum in den längerwelligen Bereich (bis 350 nm) verschoben wird [93,126].

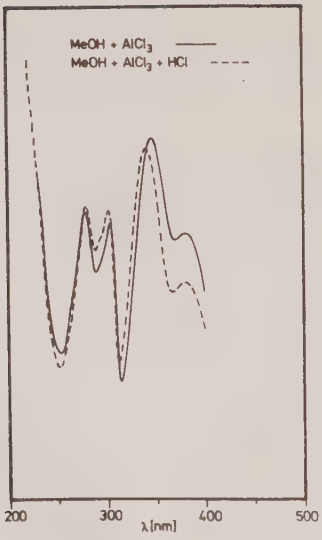
Eine bathochrome Verschiebung mit starker Intensitätszunahme der Bande I nach Zugabe von Natriummethylat (NaOMe) zur methanolischen Lösung eines Flavonoids detektiert eine 4'-OH-Gruppe [93]. Erfährt die Bande I lediglich eine Rotverschiebung bei gleichzeitiger Abnahme des Maximums gegenüber der methanolischen Flavonoidlösung, so folgt daraus die Anwesenheit einer freien 3'-OH- und einer veretherten 4'-Hydroxygruppe. Das Auftreten einer sog. Bande III im Bereich von 330 nm zeigt eine 7-OH-Gruppe an, während eine Schulter (sh) auf der langwelligen Seite der Bande II auf einen 7-O-Substituenten hindeutet [127]. Alkalisensitive Gruppen, wie z.B. 5,6- oder 3',4'-di-OH-Substitution im A- und/oder B-Ring oder eine 3',4',5'-tri-OH-Gruppierung, werden durch die Instabilität des Spektrums während der Messung angezeigt [85,92]. Der Zusatz von NaOMe zur methanolischen Lösung von 6 führte weder zu einer bathochromen Verschiebung noch zu einer Intensitätssteigerung oder -abnahme der Bande I. Das Auftreten einer Bande III konnte nicht beobachtet werden, so daß keine freien OH-Gruppen in 7- und 4'-Stellung von 6 vorliegen sollten.

Verbindung 6

MeOH	: 269, 327
NaOMe	: 272 sh, 290, 354 sh
$AlCl_3$	: 277, 303, 345, 381
$AlCl_3$/HCl	: 279, 302, 340, 380
NaOAc	: 269, 327
NaOAc/H_3BO_3	: 269, 330

(Proc. I)





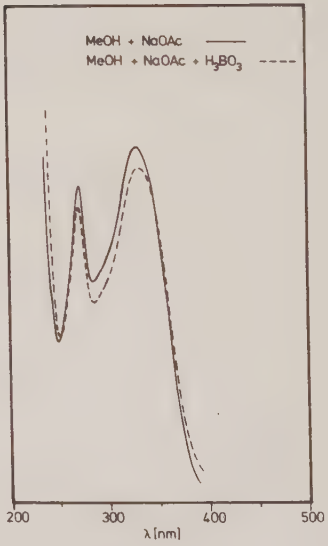


Abb. 19: UV-Spektren und λ_{max}-Werte [nm] von 6 (vgl. [128]; Abkürzungen nach [93])

Zur Detektion freier 7-OH-Gruppen hat sich die Zugabe der schwächeren Base Natriumacetat (NaOAc) bewährt (rel. Ionisationskonstanten der Flavonoid-OH-Gruppen s. [129]). Eine Intensitätszunahme oder eine bathochrome Verschiebung der Bande II um 5-20 nm zeigt die Gegenwart einer Hydroxygruppe an C-7 an. Diese Verschiebung ist jedoch klein oder gar nicht zu beobachten, wenn eine CH_3- oder eine OCH_3-Gruppe an C-6 oder C-8 im Molekül vorhanden sind [85,92,93], da der zusätzliche Substituent eine Herabsetzung der Acidität der 7-OH-Gruppe bewirkt und vor allem aber eine sterische Hinderung für den Angriff der Base darstellt. Ebenso wie mit NaOMe können Alkali-sensitive Gruppierungen auch nach Zusatz von NaOAc erkannt werden. Das UV-Spektrum von 6 zeigt nach Zugabe von NaOAc gegenüber der methanolischen Flavonoidabsorptionskurve keine Änderung.

Borsäure bildet einen Komplex mit o-Dihydroxygruppen und wird deswegen zu deren Detektion benutzt. Zeigt das Spektrum nach Zugabe von NaOAc/H_3BO_3 eine bathochrome Verschiebung der Bande I von 12-30 nm, dann liegt eine derartige Substitution im Ring B vor. Bei 6,7- bzw. 7,8-di-OH-Gruppierung im Ring A ist der Shift wesentlich geringer (5-10 nm) [85]. Im Spektrum von 6 ist keine Verschiebung der Bande I zu erkennen.

$AlCl_3$ bildet säurestabile Komplexe mit Flavonoiden, die eine 4-Ketogruppe und eine freie 3- oder 5-OH-Gruppe tragen, sowie säurelabile Komplexe mit vicinalen Hydroxygruppen. Zusatz von $AlCl_3$ zur methanolischen Lösung von 6 ergab eine starke Rotverschiebung der Bande I von 54 nm, was auf eine freie 5-OH-Gruppe ohne OH- oder OCH_3-Substitution an C-6 hindeutet [85, 92,130,131]. Gleichzeitig ist eine charakteristische Aufspaltung der beiden Hauptabsorptionsmaxima in jeweils zwei Peaks zu erkennen. Neben der starken bathochromen Verschiebung der Bande I bestätigt vor allem das Auftreten der Banden Ia und Ib die Abwesenheit eines Substituenten an C-6, da andernfalls hier nur ein Maximum zu beobachten wäre [130-132].

Auch nach HCl-Zugabe zur $AlCl_3$-komplexierten Fl-Lösung bleibt die UV-Absorptionskurve von 6 unverändert, was gegen eine vicinale Dihydroxygruppierung im Molekül spricht. Aufgrund der Kurvenform und der Lage des Maximums Ia (<395 nm) kann auch

eine 8-O-Substitution ausgeschlossen werden [130]. Da die bathochrome Verschiebung der Bande I unter 60 nm bleibt, liegt auch kein 8-C-Substituent vor [130].

Bei 6 muß es sich um ein Flavon handeln, da außer der Lage der Bande Ia unterhalb von 395 nm (nach $AlCl_3$/HCl-Zugabe), auch das Absorptionsverhältnis von Bande I/Bande II in methanolischer Lösung größer als 1 ist. Bei 3-OMe-Flavonolen mit 5,7-di-OH- oder OMe-Substitution ist dieses Verhältnis in der Regel umgekehrt [130].

Weiterhin gilt nach Voirin [130] das Erscheinen der Bande IIa (nach $AlCl_3$/HCl-Zusatz) bei einer größeren Wellenlänge als 297 nm (6: 302 nm) als Beweis für ein mono- oder trisubstituiertes (3',4',5')-B-Ring-Derivat, wobei das Verhältnis der Bande IIa/Bande IIb im Spektrum vor Zufügen von HCl Auskunft darüber gibt, welches der beiden Substitutionsmuster vorliegt. Da dieses Verhältnis bei 6 mit 0,95 größer als 0,7 ist, liegt eindeutig eine 4'-Monosubstitution vor.

Aufgrund der erfolgten UV-Messungen sollte es sich bei 6 um ein Flavon handeln, das an C-5 eine freie OH-Gruppe trägt und in 7- und 4'-Stellung verethert vorliegt.

Zur weiteren Klärung der Struktur wurde ein Massenspektrum aufgenommen. Die Massenspektren der Flavonoid-Aglyka sind im allgemeinen nicht sehr linienreich und von einem intensiven Molekülpeak gekennzeichnet, der meistens gleichzeitig den Basispeak darstellt. Zu den weiteren hervorstechenden Fragmenten zählen der A- und B-Ring, bzw. deren Folgefragmente [133-137]. Ein allgemeines Schema der MS-Fragmentierung von Flavonen und Flavonolen mit Erklärung der verwendeten Fragmentbezeichnungen ist in den Abbildungen 21 und 22 wiedergegeben.

Verbindung 6 zeigte im Massenspektrum (Abb. 20) einen Molekülpeak bei m/z 298, der gleichzeitig den Basispeak darstellt. Das Fehlen eines (M^+-15) Bruchstückes bestätigt die Abwesenheit eines 3-, 6- oder 8-OMe-Substituenten [136-140]. Die Spaltprodukte bei m/z 166 (A_1^+) und 167 (A_1^++H) sprechen für einen A-Ring mit einer Hydroxy- und einer Methoxygruppe. Durch Eliminierung von C=O aus dem Spaltprodukt (A_1^+) ist das Fragment bei m/z 138 zu erklären. Der B-Ring ist durch die Bruch-

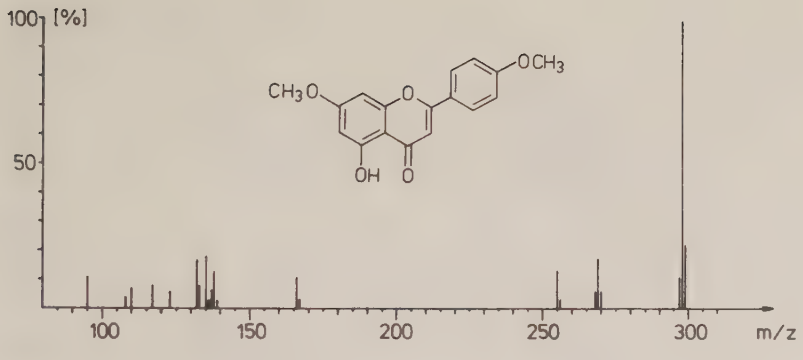


Abb. 20: MS-Spektrum von 6

stücke bei m/z 135 (B_2^+) und 132 (B_1^+) gekennzeichnet und trägt somit nur eine Methoxygruppe.

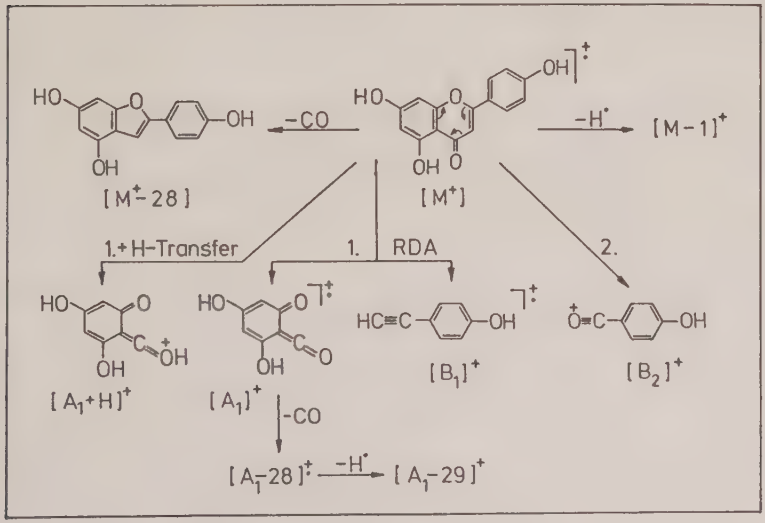


Abb. 21: MS-Fragmentierung eines Flavons am Beispiel des Apigenins (aus [137])

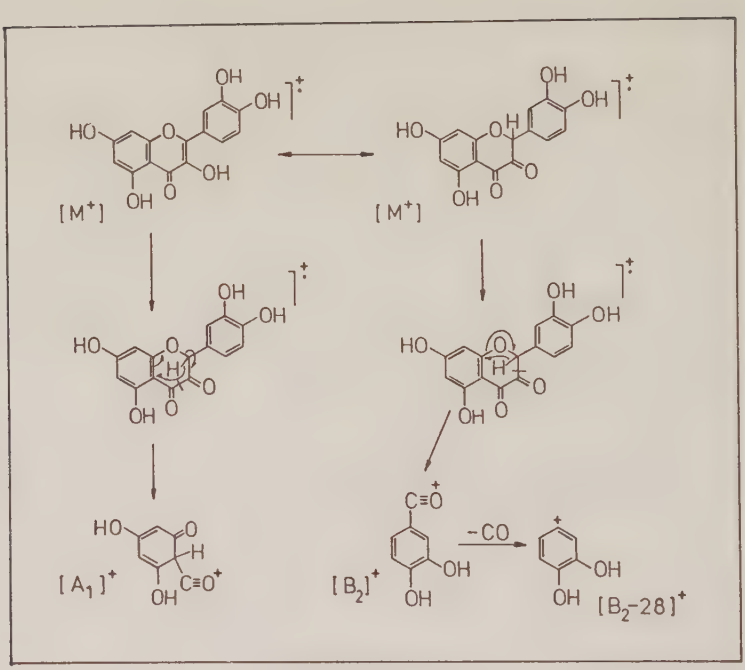


Abb. 22: MS-Fragmentierung eines Flavonols am Beispiel des Quercetins (aus [135]; Fragmentbezeichnungen nach [137])

Die IR-Spektren der Flavonoide sind im allgemeinen nicht sehr aussagekräftig. Im IR-Spektrum von 6 (Abb. 23) erscheint eine Bande für eine assoziierte Hydroxygruppe bei 3420 cm^{-1}. Die Signale bei 1665 (α,β-ungesättigte Carbonylverbindung) und 1605 cm^{-1} bestätigen die Flavonstruktur der Verbindung. Die Banden bei 1510, 1440 und 1190 cm^{-1} kennzeichnen ein aromatisches Ringsystem. Die C-O-Valenzschwingung von Aryl-alkylethern tritt bei 1250 cm^{-1} in Erscheinung und die Absorptionsbande bei 830 cm^{-1} deutet auf die 1,4-Disubstitution bzw. 1,3,4-Trisubstitution eines Aromaten hin.

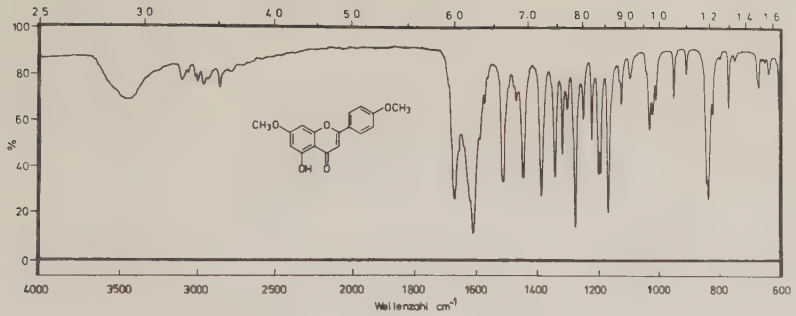


Abb. 23: IR-Spektrum von 6

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 24 und Tab. 7) zeigt für den Ring B im tiefen Feld die symmetrische Aufspaltung eines AA'XX'-Systems in zwei Dubletts, wie sie häufig bei p-substituierten Aromaten zu finden ist. Dabei gibt das Signal bei δ = 7.835 ppm die Protonen an C-2'/C-6' wieder, während, aufgrund des "shielding"-Effektes des Sauerstoff-Substituenten an C-4', die Protonen an C-3'/C-5' im höheren Feld (δ = 7.010 ppm) erscheinen.

Tab. 7: ^{1}H-NMR-Daten von 6 (Apigenin-7,4'-dimethylether); gemessen bei 400 MHz in $CDCl_3$, in Klammern Literaturwerte [141]

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
3	6.560 (6.54)	s		
6	6.349 (6.35)	d	6,8	2 (3)
8	6.469 (6.47)	d		
2'/6'	7.835 (7.82)	d	2',3'	9 (-)
3'/5'	7.010 (7.00)	d	5',6'	9 (-)
CH_3O- an C-7	3.855 (3.88)	s		
CH_3O- an C-4'	3.869 (3.88)	s		
OH- an C-5	12.816 (12.8)	s		

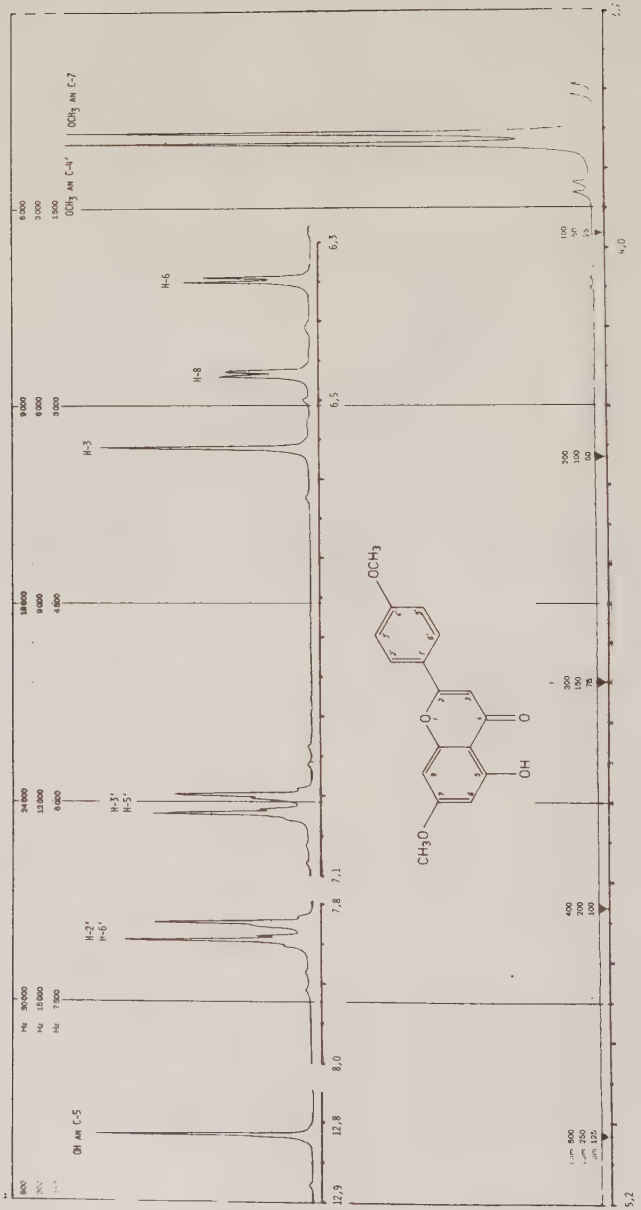


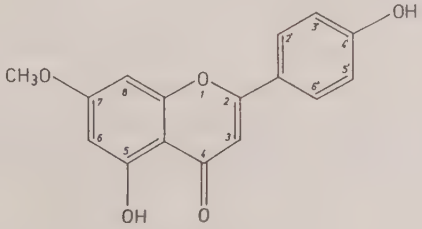
Abb. 24: ^{1}H-NMR-Spektrum von 6; δ (ppm)

Das unsubstituierte Vorliegen der Positionen 6 und 8 im Ring A wird durch das Auftreten zweier Dubletts mit einer typischen meta-Kopplung (J = 2 Hz) bestätigt, wobei H-8 im tieferen Feld in Resonanz tritt (δ = 6.469 ppm) als H-6 (δ = 6.349 ppm) [92,93,142]. H-3 erscheint als Singulett bei 6.56 ppm. Im Bereich der chemischen Verschiebung für am Aromaten lokalisierte Methoxygruppen liegen zwei Singuletts. Die Zuordnung der CH_3O-Gruppen erfolgte in Analogie zu anderen Verbindungen (z.B. 7-12), wobei festgestellt wurde, daß die Protonen der Methoxygruppen des elektronenreicheren A-Ringes im Vergleich zu denen des B-Ringes in höherem Feld in Resonanz treten. Das Proton der OH-Gruppe an C-5 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carbonylgruppe an C-4. Das Resonanzsignal dieses Protons erscheint deshalb bei δ = 12.816 ppm. Nach Markham [92] sollte dieses Signal nur zu beobachten sein, wenn als Lösungsmittel DMSO-d_6 verwendet wird. Diese Angabe wird jedoch durch eine Reihe von Autoren widerlegt, die die Messung ebenfalls in $CDCl_3$ durchführten (u.a. [143-146]).

Insgesamt belegen die UV-, MS-, IR- und ^{1}H-NMR-Daten 6 als Apigenin-7,4'-dimethylether, was im direkten Vergleich mit der authentischen Verbindung bestätigt wurde.

Apigenin-7,4'-dimethylether wurde damit erstmalig in der Gattung Arnica gefunden. Es wurde bereits 1933 von Bauer und Dietrich [147] als "Farbstoff der Birkenknospen" beschrieben und seitdem in mehreren Betulaceen [148-150] sowie u.a. in Euphorbiaceen [145], im Kernholz einer Gonystylaceae [146], in Polypodaceen [151], in den Früchten einer Piperaceae [152], in Lamiaceen [153-155], in den oberirdischen Organen von Baccharis-Arten (Asteraceae) [141,156], in einer Cistaceae [157] und im Rhizom einer Zingiberaceae [158] nachgewiesen.

4.3.2. Isolierung und Identifizierung von 7 (Genkwanin)



Genkwanin

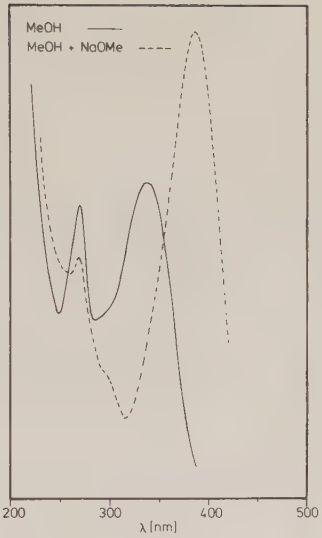
Verbindung 7 fiel aus der methanolischen Lösung der Fraktion SF I/5 nach längerem Stehen im Kühlschrank aus und konnte nach mehrfachem Umkristallisieren aus Methanol als grünlichgelbe Substanz gewonnen werden. Mit einem R_f-Wert von 0,45 (System 6) war sie deutlich polarer als 6, fluoreszierte aber wie diese nach Besprühen mit NA-Reagenz grünlichgelb.

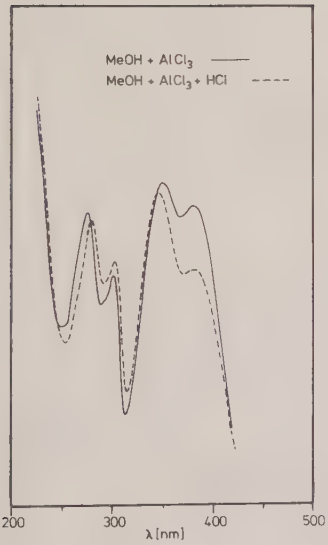
Die UV-Spektren (UV-Daten und -Spektren s. Abb. 25) unter Zusatz von Verschiebungsreagenzien [92,93] führten zu folgenden Strukturhinweisen (Diskussion s. bei 6, Kap. 4.3.1., S. 39):

- MeOH: Flavon bzw. 3-OMe-Flavonol mit monosubstituiertem B-Ring, da nur 2 Maxima bei 269 und 336 nm auftreten.
- NaOMe: Die starke bathochrome Verschiebung um 50 nm bei gleichzeitigem Intensitätsanstieg der Bande I deutet auf das Vorliegen einer 4'-OH-Gruppe hin. Die Schulter bei 297 nm auf der langwelligen Seite der Bande II gibt einen 7-O-Substituenten zu erkennen [127]. Da das Spektrum längere Zeit stabil bleibt, sind keine o-Dihydroxygruppen im Molekül vorhanden.
- $AlCl_3$: Freie 5-OH-Gruppe, jedoch keine 6-O-Substitution, da eine charakteristische Aufspaltung der Bande I in 2 Peaks und eine bathochrome Verschiebung von 46 nm beobachtet wird [130].
- $AlCl_3$/HCl: Form und Lage des Maximums Ia schließen eine 6- und 8-C- bzw. O-Substitution aus [130]. Da die Bande IIa oberhalb von 297 nm im Spektrum erscheint (301 nm), könnte, nach Berechnung des Absorptionsverhältnisses der Banden IIa/IIb in neutralem $AlCl_3$ (Erklärung s. Kap. 4.3.1.), ein Flavon mit 4'-Monosubstitution vorliegen. Verbindung 7 besitzt keine vicinalen Dihydroxygruppen, da die Lage der Bande I (Ia und Ib) nahezu unverändert ist gegenüber der neutralen $AlCl_3$-Flavonoidlösung.
- NaOAc: Keine freie 7-OH-Gruppe; Bestätigung der 4'-Hydroxygruppe. Das Spektrum bietet insgesamt ein ähnliches Bild wie nach NaOMe-Zugabe (vgl. Abb. 25), was auf die Verwendung von Essigsäure-freiem NaOAc zurückzuführen ist [93].

Verbindung 7

MeOH	: 269, 336
NaOMe	: 268, 297 sh, 386
$AlCl_3$	: 276, 302, 351, 382
$AlCl_3$/HCl	: 278, 301, 345, 380
NaOAc	: 257 sh, 268, 298 sh, 386
$NaOAc/H_3BO_3$ (Proc. I)	: 268, 298 sh, 340





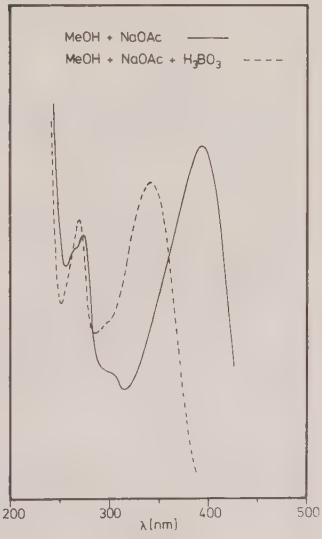


Abb. 25: UV-Spektren und λ_{max}-Werte [nm] von 7 (vgl. [128]; Abkürzungen nach [93])

- NaOAc/H_3BO_3: Keine o-Dihydroxygruppen im A- oder B-Ring.

Unter zusätzlicher Berücksichtigung des Absorptionsverhältnisses der Bande I/Bande II in methanolischer Lösung (>1) sollte es sich bei 7 um ein Flavon (kein 3-OMe-Flavonol) mit OH-Gruppen an C-5 und C-4' sowie vermutlich einer Methoxygruppe an C-7 handeln.

Das Massenspektrum (Abb. 26; Erklärung der Fragmentbezeichnungen s. Abb. 21, S. 43) zeigt einen Molekülpeak (Basispeak) bei m/z 284. Die Folgefragmente bei m/z 166 (A_1^+), 167 (A_1^++H), 118 (B_1^+) und 121 (B_2^+) weisen auf ein Flavon hin mit je einer OH-Gruppe im A- und B-Ring. Zusätzlich muß eine Methoxygruppe im A-Ring lokalisiert sein.

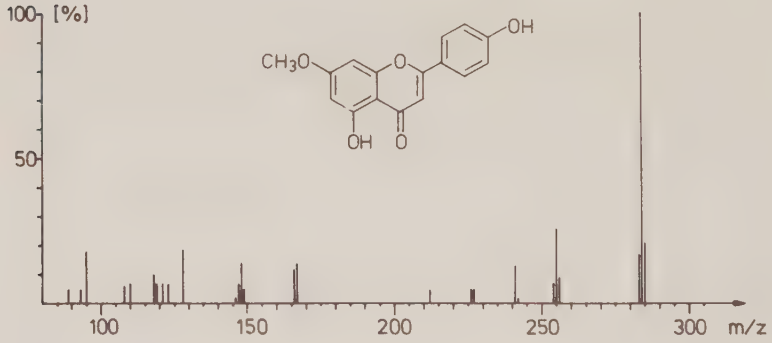


Abb. 26: MS-Spektrum von 7

Im IR-Spektrum von 7 (Abb. 27) erscheinen bei 1660 und 1600 cm^{-1} die typischen Absorptionsbanden eines Flavons.

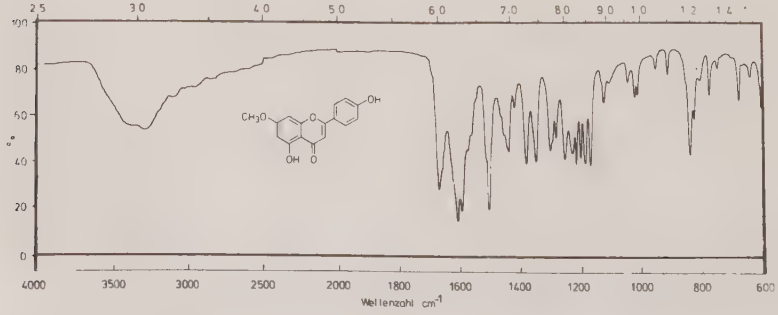


Abb. 27: IR-Spektrum von 7

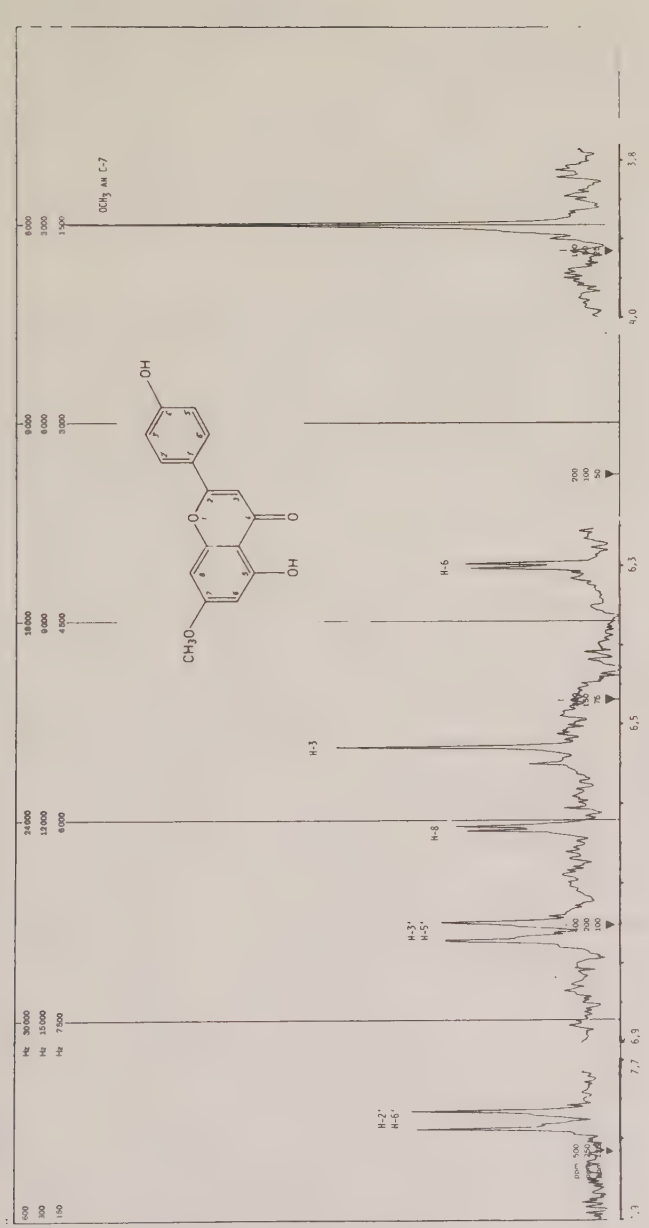


Abb. 28: ^{1}H-NMR-Spektrum von 7; δ (ppm)

Die Signale bei 1585, 1500, 1195 und 1180 cm^{-1} kennzeichnen ein aromatisches Ringsystem. Bei 3400 cm^{-1} liegt die breite Absorptionsbande der OH-Gruppen und das Signal bei 835 cm^{-1} weist auf die 1,4-Disubstitution eines Aromaten hin.

Aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 28) geht hervor, daß es sich bei 7 um einen Monomethylether des Apigenins handelt, da die Resonanzsignale der Protonen im Aufspaltungsmuster denen von 6 gleichen.

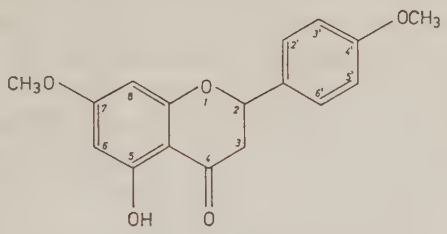
Tab. 8: ^{1}H-NMR-Daten von 7 (Genkwanin); gemessen bei 400 MHz in Methanol-d_4, in Klammern Literaturwerte, bestimmt in CCl_4, nach [159]

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
3	6.529 (6.35)	s		
6	6.301 (6.22)	d	6,8	2 (2)
8	6.631 (6.52)	d		
2'/6'	7.776 (7.78)	d	2',3'	9 (9)
3'/5'	6.760 (6.88)	d	5',6'	9 (9)
CH_3O- an C-7	3.881 (3.90)	s		

Schmelzpunkt, die UV-, MS-, IR- und ^{1}H-NMR-Daten weisen 7 als den Apigenin-7-methylether Genkwanin aus. Genkwanin ist bereits in A. cordifolia gefunden worden [160], die ebenfalls zur Untergattung Austromontana gehört (s. Tab. 1).

Genkwanin wurde erstmals aus den Blüten von Daphne genkwa isoliert [94]. Es ist seitdem häufiger, oft neben Apigenin-7,4'-dimethylether (6), in verschiedenen Pflanzenteilen nachgewiesen worden [145,149-151,153,159-166].

4.3.3. Isolierung und Identifizierung von 8 (Naringenin-7,4'-dimethylether)



Naringenin-7,4'-dimethylether

Verbindung 8 konnte aus Fraktion SF I/2 aus Diethylether in der Kälte auskristallisiert werden. Nach Umkristallisieren aus Diethylether/Pentan (9:1) lag sie in Form langer, farbloser Nadeln vor (Schmp.: 114-115,5°C). Mit einem R_f-Wert von 0,77 (System 6) handelte es sich bei ihr um die lipophilste Komponente der Flavonoid-Gesamtfraktion (s. Abb. 18, S. 37). Nach Besprühen mit NA-Reagenz zeigte sie eine sehr blasse, gelbliche Fluoreszenz. Bei Tageslichtbetrachtung erschien sie zuerst schwach gelblich und färbte sich nach einiger Zeit leicht bräunlich. Während 6 und 7 bei Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz stets nur eine Intensivierung ihrer gelben Farbe zeigten, färbte sich 8 sofort charakteristisch orange.

Zur Charakterisierung des Flavonoidgerüstes wurde wieder eine UV-Analyse in Gegenwart der üblichen Verschiebungsreagenzien durchgeführt und die Messungen nach [92,93] ausgewertet (Abb. 29).

Bereits die methanolische Lösung von 8 zeigte eine UV-Absorptionskurve, die sich deutlich von den Spektren der Verbindungen 6 und 7 (s. Abb. 19 und 25, S. 40 und 49) unterschied. Bande I war wenig ausgeprägt und erschien bei 335 nm, während Bande II ein starkes Absorptionsmaximum bei 288 nm zeigte. Ähnliche Absorptionskurven mit einer Hauptabsorptionsbande zwischen 270 nm und 295 nm zeigen Flavanone und Flavanonole [89,93]. Das Vorliegen eines Isoflavons konnte aufgrund der Lage des Absorptionsmaximums der Bande II ausgeschlossen werden, da diese im Bereich von 240-270 nm absorbieren [89,93].

Die UV-Spektren der Flavanone bzw. Flavanonole mit 5,7-Di-OH-Substitution zeigen nach NaOMe-Zugabe eine bathochrome Verschiebung von ca. 34-40 nm des Hauptabsorptionsmaximums (Bande II). Fehlt die 5-OH-Gruppe, liegt die Verschiebung im Bereich von 55-60 nm [93]. In beiden Fällen ist ein Intensitätsanstieg der Bande II zu beobachten. Flavanone mit 5,6,7- oder 6,7,8-Hydroxylierung bleiben während der Messung nicht stabil und können durch ein nicht konstant bleibendes Spektrum erkannt werden. Auf Zusatz von NaOMe zeigt das UV-Spektrum von 8 eine leichte Rotverschiebung der Bande I von 335 nm nach 357 nm mit geringem Intensitätsanstieg, während Bande II unverändert, jedoch mit leichtem Intensitätsverlust, bei 288 nm erscheint. Mit einer 5,7-Di-OH-Substitution im Molekül ist deshalb nicht zu rechnen. Die Intensitätsabnahme der Bande II kann möglicherweise als Hinweis auf eine verätherte 7-Hydroxygruppe gewertet werden.

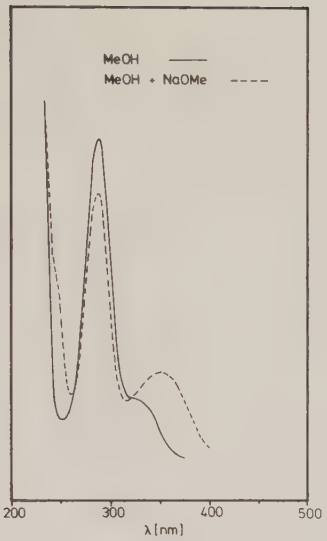
Da bei Flavanonen bzw. Flavanonolen die Konjugation des B-Ringes mit der Carbonylgruppe unterbrochen ist, kann bei dieser Substanzgruppe nur wenig über die Substitution des B-Ringes ausgesagt werden. Die spektralen Daten beziehen sich in erster Linie auf den A-Ring [168]. Würde jedoch die Verbindung eine 4'-OH-Gruppe besitzen, dann würde sie als Flavanon unter diesen Bedingungen (verd. Alkali) sofort in das korrespondierende Chalkon übergehen, das in der ionisierten Form ein breites Maximum im Bereich von 400-450 nm zeigen würde [168].

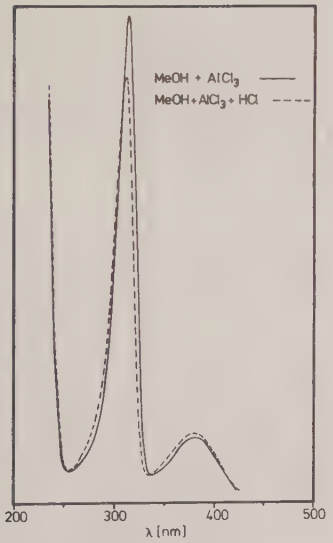
Wie bei den Flavonen ist die Detektion einer freien 7-OH-Gruppe durch den Zusatz von NaOAc zur methanolischen Lösung möglich. Bei 5,7-Dihydroxyflavanonen bzw. Flavanonolen erfolgt ein bathochromer Shift von 34-37 nm, während eine Rotverschiebung von 51-58 nm für 5-Desoxyverbindungen typisch ist. 5,6,7-Trihydroxy-Flavanone werden durch die Instabilität des Spektrums angezeigt. Die Messung des UV-Spektrums von 8 in Gegenwart von NaOAc ergab keine Änderung gegenüber der methanolischen Absorptionskurve. Ohne Ausschluß eines Substituenten in Stellung 6 oder 8 kann aus dem Fehlen einer bathochromen Verschiebung der Bande II jedoch nicht auf die Abwesenheit einer freien 7-OH-Gruppe geschlossen werden [170].

Verbindung 8

MeOH	: 288, 335
NaOMe	: 288, 357
$AlCl_3$	: 312, 380
$AlCl_3$/HCl	: 310, 378
NaOAc	: 288, 335
NaOAc/H_3BO_3	: 288, 335

(Proc. I)





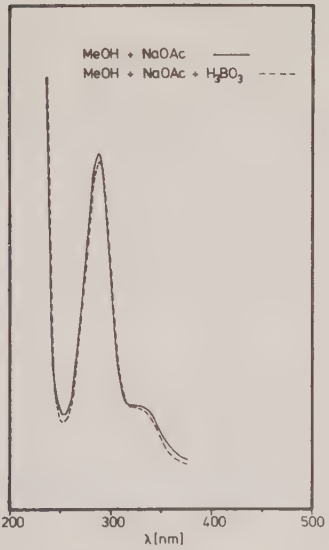


Abb. 29: UV-Spektren und λ_{max}-Werte [nm] von 8 (vgl. [169]; Abkürzungen nach [93])

Wegen der fehlenden Konjugation mit der Carbonylgruppe ist es auch nicht möglich o-Dihydroxygruppen im Ring B mit $NaOAc/H_3BO_3$ zu detektieren. Eine Verschiebung der Bande I um 10-15 nm in den längerwelligen Bereich erlaubt jedoch das Erkennen einer 6,7-Dihydroxygruppierung im A-Ring. Nach $NaOAc/H_3BO_3$-Zugabe veränderten sich bei 8 jedoch weder Form noch Lage der Absorptionsbanden.

Auch mit neutralem oder salzsaurem $AlCl_3$ als Shiftreagenz ist bei Flavanonen und Flavanonolen die Detektion von 3',4'-Dihydroxygruppen nicht möglich. Ein bathochromer Effekt der mit $AlCl_3$-Zusatz gemessenen Banden I und II im Vergleich zu dem nach $AlCl_3$/HCl-Zugabe aufgenommenen Spektrum ist jedoch für 6,7- und 7,8-Dihydroxygruppen charakteristisch. Freie 5-OH-Gruppen sind durch die bathochrome Verschiebung der Bande II um 20-26 nm detektierbar. Diese Verschiebung bleibt auch nach HCl-Zugabe konstant. Bei Anwesenheit einer 6-OMe-Gruppe ist jedoch die Komplexbildung vermutlich wegen sterischer Hinderung nicht möglich [170], weshalb hier fast kein Effekt zu beobachten ist.

Beim Vergleich der spektralen Daten von 8, gemessen nach $AlCl_3$- und $AlCl_3$/HCl-Zusatz, ergibt sich eine Verschiebung der Bande II um 22-24 nm, was auf eine freie 5-OH-Gruppe ohne 6-OMe-Substituenten hindeutet. Da beide Spektren nahezu identische Verschiebungen aufweisen, ist keine 6,7- oder 7,8-Dihydroxygruppierung im Molekül enthalten.

Nach Auswertung der UV-Meßergebnisse sollte 8 eine Flavanon- oder Flavanonol-Grundstruktur besitzen, mit einer freien Hydroxygruppe an C-5 und einem O-Alkylsubstituenten an C-7 und C-4'.

Im MS-Spektrum (Abb. 31) fällt sofort auf, daß der Molekülpeak bei m/z 300 nicht, wie bei den Flavonen, den Basispeak bildet. Das MG von 8 ist um 2 Masseneinheiten höher als bei 6 und weist auf ein Flavonoid mit gesättigtem C-Ring hin. Da Flavanone durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion die gleichen A-Ring-Fragmente zeigen wie Flavone (Erklärung des Fragmentierungsschemas und der Fragmentbezeichnung s. Abb. 30), muß der A-Ring von 8 aufgrund der Fragmente bei m/z 166 (A_1^+) und 167 (A_1^++H) Träger einer Methoxy- und einer Hydroxygruppe sein.

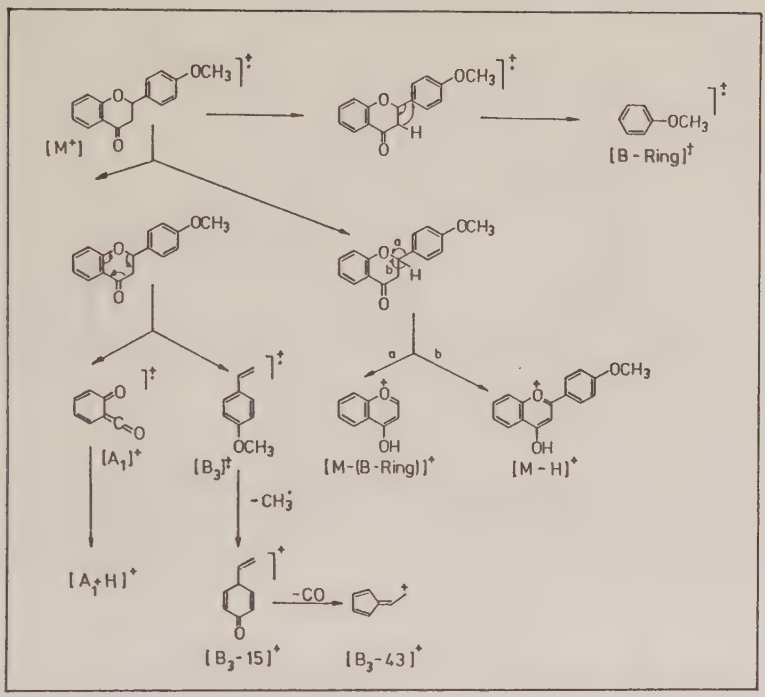


Abb. 30: MS-Fragmentierung eines Flavanons am Beispiel des 4'-Methoxyflavanons (zusammengestellt aus [134,135,137])

Basispeak ist das B_3-Fragment bei m/z 134, das im Gegensatz zum B_1-Fragment (s. Abb. 21) eine Ethylengruppe trägt. Das Folgefragment bei m/z 119 (B_3^+-Me) bestätigt die Methoxygruppe im B-Ring. Bereits 1965 veröffentlichten Pelter et al. [137], daß das B_3-Fragment bei 4'-Methoxyflavanonen stets den Basispeak bildet. Durch Abspaltung des B-Ringes aus dem Molekül ist das Fragment bei m/z 193 zu erklären, während der B-Ring bei m/z 108 erscheint. Fragmente, die auf ein Flavanonol hindeuten, konnten dem Spektrum nicht entnommen werden (s. [135]).

Das IR-Spektrum (Abb. 32) bestätigt mit der Absorptionsbande bei 3440 cm^{-1} (assoziierte Hydroxygruppe) die freie 5-OH-Gruppe. Bei 1630 cm^{-1} findet man das Signal für eine chelatisierte Carbonylgruppe [171]. Das aromatische Ringsystem ist

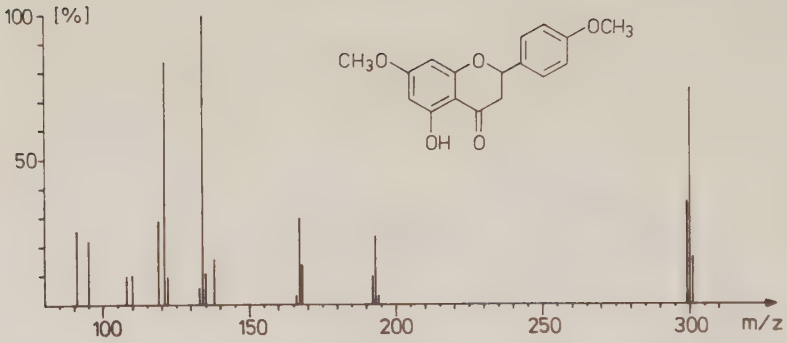


Abb. 31: MS-Spektrum von 8

durch die Banden bei 1580, 1520 und 1460 cm^{-1} gekennzeichnet. Die C-O-Valenzschwingung eines Arylalkylethers erscheint bei 1250 cm^{-1} und die Bande bei 830 cm^{-1} deutet auf eine 1,4-Substitution eines Aromaten hin.

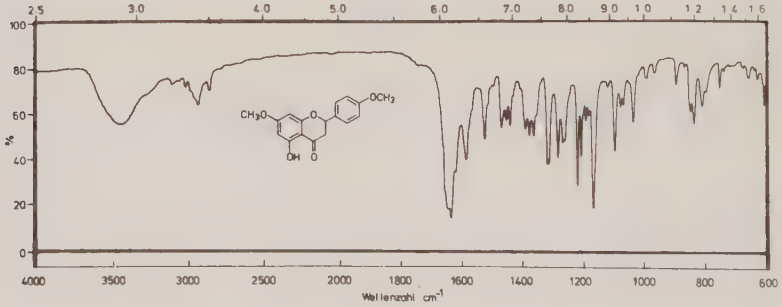


Abb. 32: IR-Spektrum von 8

Die Flavanonstruktur von 8 wird auch durch die ^{1}H-NMR-Daten sichergestellt (s. Abb. 33 und Tab. 9).

Die A-Ring-Protonen H-6 und H-8 erscheinen als meta-koppelnde Dubletts bei δ = 6.048 und 6.080 ppm. Wie von Mabry [93] beschrieben, liegen die Resonanzfrequenzen dieser Protonen in höherem Feld als die A-Ring-Protonen des entsprechenden Flavons (vgl. 6, Tab. 7). Durch die symmetrische Aufspaltung der

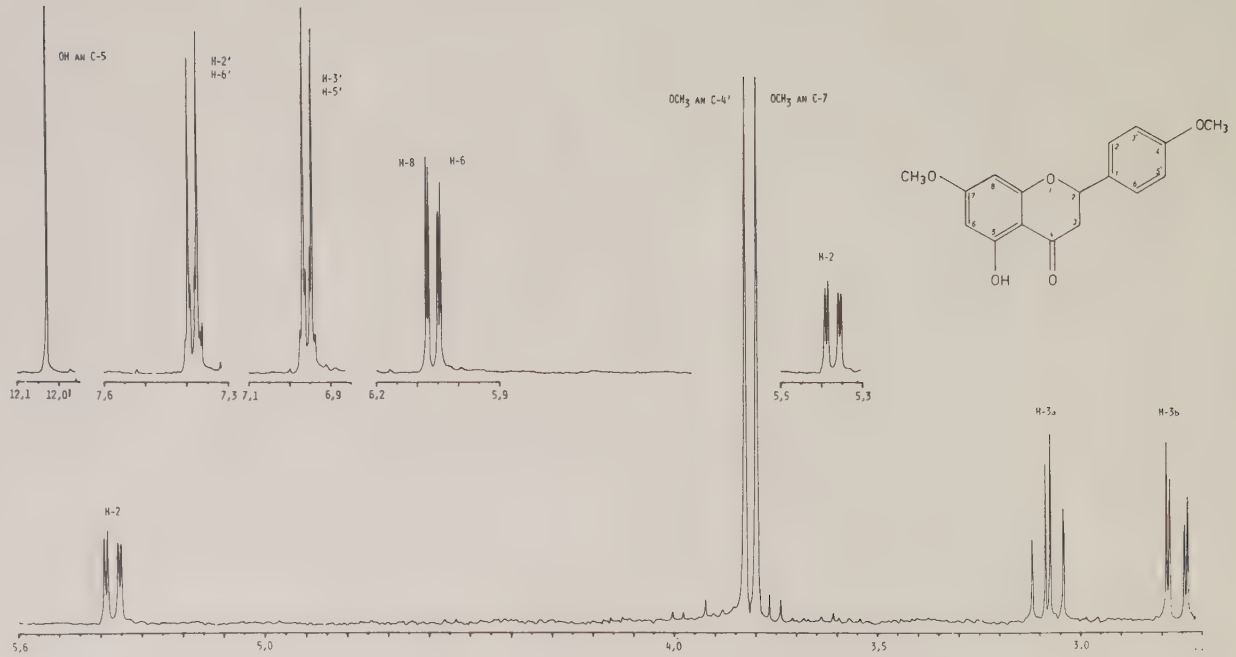


Abb. 33: ^{1}H-NMR-Spektrum von 8; δ (ppm)

B-Ring-Protonen in zwei Dubletts (δ = 6.955 und 7.388 ppm) wird die 4'-Substitution bestätigt. Die nach dem MS-Spektrum zu erwartenden zwei Methoxygruppen erscheinen als Singuletts bei δ = 3.798 und 3.830 ppm. Das Singulett bei 12.025 ppm ist dem Resonanzsignal der freien Hydroxygruppe an C-5 zuzuschreiben.

Die 3 Protonen des C-Ringes zeigen das Aufspaltungsmuster eines ABX-Systems. Aufgrund der tiefen Lage muß das Doppeldublett bei δ = 5.375 ppm dem Proton H-2 (X-Teil) zugeordnet werden, denn es zeigt eine große trans-diaxiale Kopplung von 13 Hz mit dem Proton H-3a (AB-Teil) und eine kleinere Kopplung mit dem äquatorial stehenden H-3b (AB-Teil). Neben der Kopplung mit H-2 zeigt H-3a (δ = 3.088 ppm), genau wie H-3b (δ = 2.770 ppm) eine geminale Kopplung von 17 Hz. Die vollständigen ^{1}H-NMR-Daten sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Tab. 9: ^{1}H-NMR-Daten von 8 (Naringenin-7,4'-dimethylether); gemessen bei 400 MHz in $CDCl_3$, in Klammern Literaturwerte, bestimmt in Aceton-d_6, nach [172]

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
2	5.375 (5.48)	dd	2,3a	13 (-)
3a	3.088 (2.98)	dd	2,3b	3 (-)
3b	2.770 (2.98)	dd	3a,3b	17 (-)
6	6.048 (6.05)	d	6,8	2 (-)
8	6.080 (6.05)	d		
2'/6'	7.388 (7.50)	d	2',3'	9 (-)
3'/5'	6.955 (6.98)	d	5',6'	9 (-)
CH_3O- an C-7	3.798 (3.87)	s		
CH_3O- an C-4'	3.830 (3.82)	s		
OH- an C-5	12.025 (12.20)	s		

Durch Schmelzpunkt sowie die UV-, MS-, IR- und ^{1}H-NMR-Daten ist 8 eindeutig als Naringenin-7,4'-dimethylether identifiziert. Damit ist zum ersten Mal auch das Vorkommen von Flavanonen in der Gattung Arnica nachgewiesen.

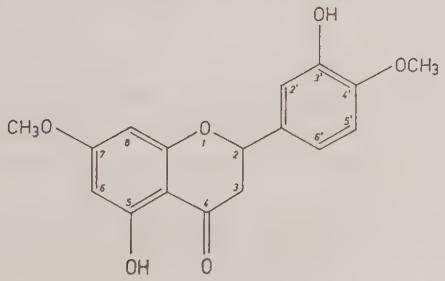
Der 7,4'-Dimethylether des Naringenins ist außer in Asteraceen [169,172-174], u.a. auch in Betula-Species [150], in einer Polypodiaceae [170] und in Species aus der Familie der Cactaceae [175] identifiziert worden.

4.4. Isolierung von 9 und 10

In Fraktion SF I/4 ließen sich dc im System 6 vier Verbindungen (9-12) nachweisen, die nach Detektion mit NA-Reagenz gelblich bis gelb fluoreszierten. Bei Besprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz färbten sich zwei der Verbindungen (9 und 10) genau wie 8 orange. Beide Verbindungen lagen in einer wesentlich geringeren Konzentration als 11 und 12 vor. Die Hauptmenge von 11 und 12 konnte nach Kristallisation als gelber Niederschlag in der Kälte abgetrennt werden. Danach waren 9 und 10 im Filtrat stark angereichert. Da sich beide Substanzen dc im System 2 (R_f = 0,58) vollständig von 11 und 12 (R_f = 0,33) abtrennten, wurde eine weitere sc Trennung an Kieselgel mit Petrolether (40-60°C)/Diethylether durchgeführt (s. Kap. 12.10.). Dabei fielen in Fraktion SF II/2 9 und 10 und in Fraktion SF II/4 11 und 12 jeweils zusammen an. In geringen Mengen wurde hierbei bereits 9 in Form farbloser langer Nadeln in Fraktion SF II/3 erhalten.

Um größere Substanzmengen von 9 zu erhalten und auch 10 zu gewinnen, wurde die Fraktion SF II/2 über eine präparative DC im System 6 aufgetrennt. Danach lagen nach mehrfachem Umkristallisieren beide Verbindungen dc in mehreren Systemen einheitlich vor.

4.4.1. Identifizierung von 9 (Persicogenin)



Persicogenin

Da 9 das gleiche Farbverhalten gegenüber dem Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz zeigte wie 8, wurde hier ebenfalls das Vorliegen eines Flavanons vermutet.

Die in Gegenwart von verschiedenen Shift-Reagenzien ([92,93], s. auch 8) aufgenommenen UV-Spektren (s. Abb. 34) zeigten folgende Ergebnisse:

- MeOH: Flavanon- bzw. Flavanonol-Absorptionsspektrum mit Maxima bei 330 nm (Bande I) und 287 nm (Bande II).
- NaOMe: Bande I wird bathochrom um 20 nm und Bande II um 2 nm verschoben, wobei, ähnlich wie bei 8, ein leichter, aber stetiger Intensitätsanstieg der Bande I und eine leichte Intensitätsabnahme der Bande II zu beobachten ist. Die Lage der Maxima bleibt jedoch unverändert. Der leichte Intensitätsverlust der Bande II wird evtl. auch hier durch eine veretherte 7-OH-Gruppe verursacht (vgl. 8). Mit einer freien 4'-Hydroxygruppe ist nicht zu rechnen.
- NaOAc und NaOAc/H_3BO_3: Keine Änderung gegenüber dem UV-Spektrum in methanolischer Lösung ohne Zusatz von Shiftreagenzien, d.h., keine vicinalen Dihydroxygruppen im A-Ring, möglicherweise jedoch eine 6- oder 8-O-Substitution.
- $AlCl_3$ und $AlCl_3$/HCl: Bande I wird jeweils um 50 bzw. 45 nm und Bande II um 25 bzw. 21 nm in den längerwelligen Bereich verschoben. Die fast identischen Spektren weisen auf eine freie 5-OH-Gruppe und auf die Abwesenheit von 6,7- oder 7,8-Dihydroxygruppen hin.

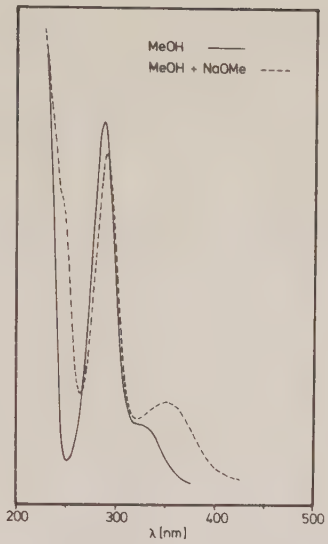
Nach den UV-Spektren sollte es sich bei 9 um ein Flavanon oder Flavanonol handeln, das in 7- und 4'-Stellung durch O-Alkylreste substituiert ist und eine freie OH-Gruppe an C-5 besitzt. Über weitere O-Alkyl- oder Hydroxysubstitutionen können keine Aussagen gemacht werden.

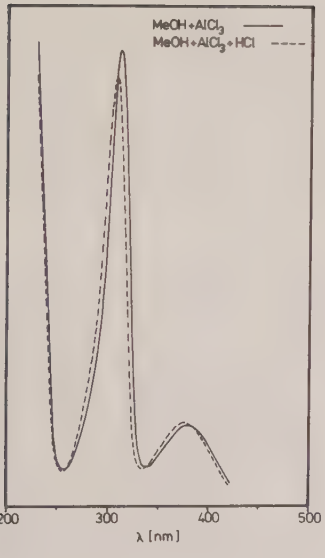
Eine Klärung über die Art der Substituenten von 9 liefert das MS-Spektrum (Abb. 35). Der Molekülpeak bei m/z 316 deutet auf ein Flavonoid mit gesättigtem C-Ring sowie zwei Methoxy- und zwei Hydroxygruppen hin. Im Spektrum finden sich die gleichen A-Ring-Fragmente bei m/z 166 und 167 wie für 6-8 (Erklärung der Fragmentbezeichnung s. Abb. 30, S. 57), der

Verbindung 9

MeOH	: 287, 330
NaOMe	: 245 sh, 289, 350
$AlCl_3$	: 312, 380
$AlCl_3$/HCl	: 308, 375
NaOAc	: 287, 330
NaOAc/H_3BO_3	: 288, 330

(Proc. I)





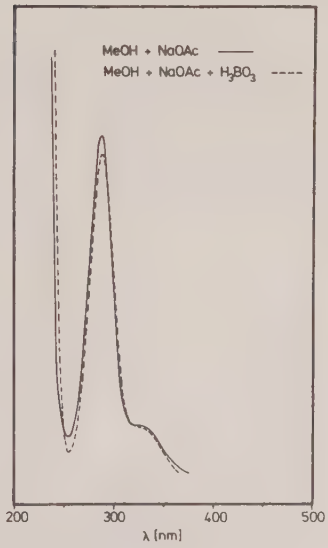


Abb. 34: UV-Spektren und λ_{max}-Werte [nm] von 9 (vgl. [170]; Abkürzungen nach [93])

somit wieder Träger einer CH_3O- und einer OH-Gruppe sein muß. Durch Eliminierung von -HCO aus dem A_1-Spaltprodukt ist der Basispeak bei m/z 137 zu erklären. Weitere Folgefragmente bei m/z 150 (B_3^+), 135 (B_3^+-CH_3) und 124 (B-Ring$^+$) zeigen das Vorliegen eines Flavons an und gleichzeitig, daß am B-Ring die andere OH- und CH_3O-Gruppe lokalisiert sind.

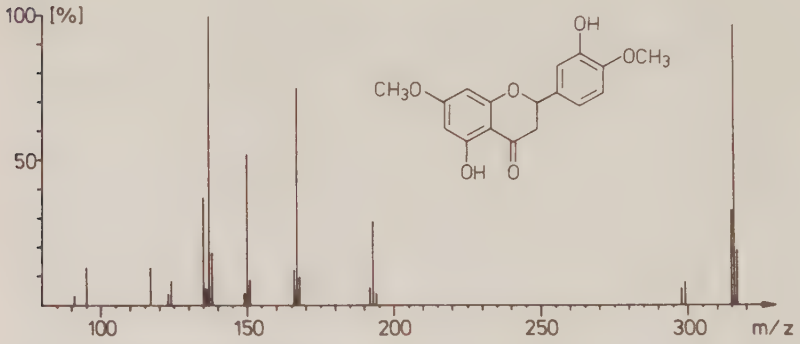


Abb. 35: MS-Spektrum von 9

Im IR-Spektrum von 9 (Abb. 36) sind die für Flavanone (1640 cm^{-1}, C=O; Aromatenbanden bei 1565, 1530 und 1510 cm^{-1}) mit freien OH-Gruppen (3380 cm^{-1}) und Methoxysubstitution am Aromaten (1255 cm^{-1}) typischen Banden zu finden. Bei 835 cm^{-1} liegt das Signal für einen 1,4-di- bzw. 1,3,4-trisubstituierten Aromaten.

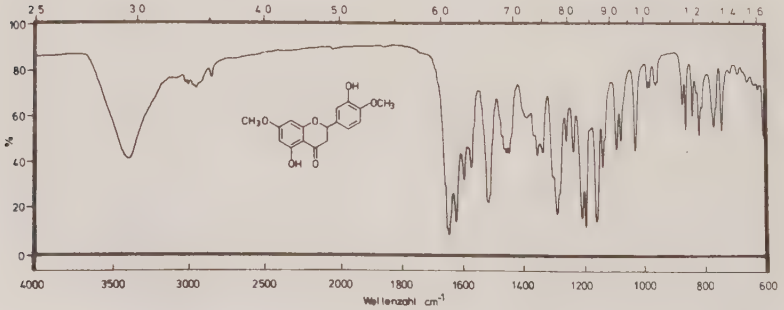


Abb. 36: IR-Spektrum von 9

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 37) bestätigt die bisherigen Ergebnisse. Im Spektrum erscheinen für die A- und C-Ring-Protonen die gleichen Resonanzsignale wie sie bereits bei 8 diskutiert wurden. Lediglich die im tiefen Feld in Resonanz tretenden B-Ring-Protonen zeigen durch die Einführung eines weiteren Substituenten jetzt das Aufspaltungsmuster eines AMX-Systems. H-5' (M-Teil) erscheint als Dublett bei δ = 6.880 ppm (J = 8.5 Hz) und koppelt mit dem ortho-ständigen H-6' (A-Teil), das als Doppeldublett bei δ = 6.925 ppm erscheint. Der zweite Kopplungspartner des 6'-Protons ist H-2' (X-Teil), dem somit das Signal bei δ = 7.040 ppm zuzuordnen ist. Sämtliche ^{1}H-NMR-Daten von 9 sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tab. 10: ^{1}H-NMR-Daten von 9 (Persicogenin); gemessen bei 400 MHz in $CDCl_3$, in Klammern Literaturwerte nach [178]

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
2	5.323 (5.33)	dd	2,3a	13 (6)
3a	3.053 (2.85)	dd	2,3b	3 (5)
3b	2.755 (2.85)	dd	3a,3b	17 (-)
6	6.045 (6.05)	d	6,8	2 (-)
8	6.070 (6.05)	d		
2'	7.040 (6.95)	d	2',6'	2 (-)
5'	6.880 (6.95)	d	5',6'	8.5 (-)
6'	6.925 (6.95)	dd		
CH_3O- an C-7	3.795 (3.79)*	s		
CH_3O- an C-4'	3.905 (3.90)*	s		
OH- an C-5	12.015 (--)	s		
	5.705**	s		

* Zuordnung vertauschbar

** Das Singulett bei δ = 5.705 ppm ist vermutlich das Resonanzsignal des Protons der OH-Gruppe an C-3'

Nach den UV-, MS-, IR- und ^{1}H-NMR-Daten sollte es sich bei 9 um den 7,4'-Dimethylether von Eriodictyol handeln, wofür auch der Schmelzpunkt bei 160-161°C spricht (Eriodictyol-7,4'-di-

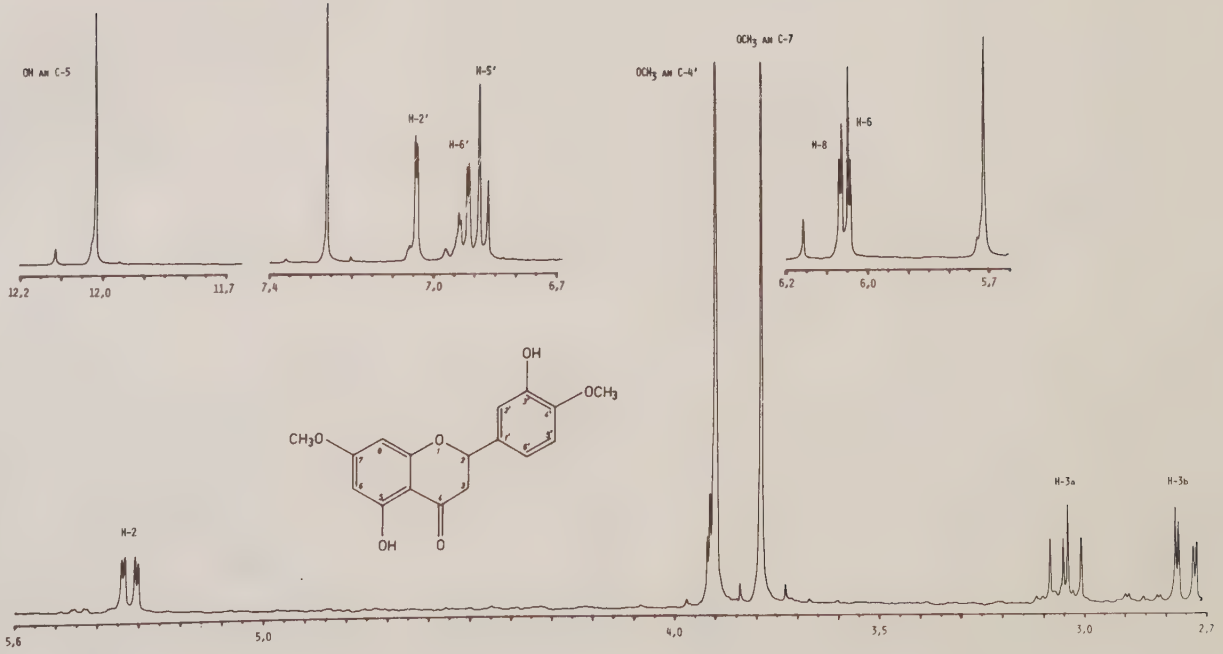


Abb. 37: ^{1}H-NMR-Spektrum von 9; δ (ppm)

methylether: Schmp.: 160°C [170]; 163-164°C [176]). Der Schmelzpunkt des isomeren 7,3'-Dimethylethers liegt wesentlich niedriger (145-147°C [173]; 148-150°C [177]).

Eine Unterscheidung der beiden sehr ähnlichen Stellungsisomeren ist auch mit Hilfe des UV-Spektrums nach Zusatz von NaOMe möglich. Auch in der hier vorliegenden sehr verdünnten alkalischen Lösung werden 4'-OH-Flavanone sehr schnell in die Chalkonform überführt [93,168]. Dies sollte auch möglich sein, wenn zusätzlich eine 3'-OMe-Gruppe im Molekül vorhanden ist. Die Methoxygruppe erhöht zwar durch den +M-Effekt die Elektronendichte im Kern und stellt eine sterische Hinderung für den Angriff des NaOMe-Reagenz dar, doch sollte dies kein Hindernis für den Übergang des Flavanons zum Chalkon bedeuten. Möglicherweise erfolgt die Umwandlung nicht so schnell wie in einem Molekül, das nur eine 4'-Hydroxygruppe besitzt, sie sollte aber bei einem Flavanon mit einer 3'-OMe-4'-OH-Substitution deutlich schneller ablaufen als bei dem isomeren Molekül.

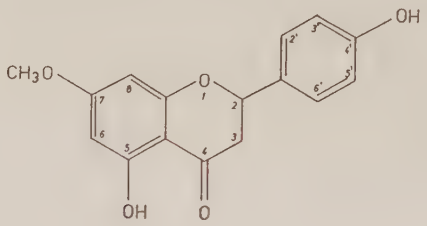
Diese Überlegungen wurden durch die UV-Spektren der authentischen Flavanone Eriodictyol-7,3'- und -7,4'-dimethylether* voll bestätigt. Nur bei Eriodictyol-7,3'-dimethylether, nicht aber beim isomeren 7,4'-dimethylether und der Substanz 8, bildete sich ein breites Maximum bei 437 nm aus.

Persicogenin (Eriodictyol-7,4'-dimethylether) wurde erstmals aus Prunus persica (Rosaceae) isoliert [176,179] und konnte auch in Notholaena Species (Polypodiaceae) [170] nachgewiesen werden.

---

* Herrn Prof. Dr. E. Wollenweber, Institut für Botanik der TH Darmstadt, danke ich für die Überlassung je einer Probe Persicogenin und Eriodictyol-7,3'-dimethylether.

4.4.2. Identifizierung von 10 (Sakuranetin)



Sakuranetin

Die UV-Analyse von 10 (Abb. 38) führte zu folgenden Strukturhinweisen:

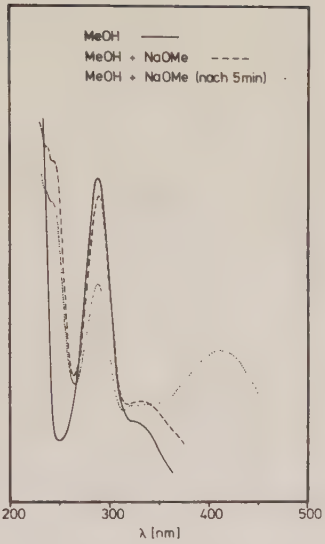
- MeOH: Typisches Flavanon- oder Flavanonolabsorptionsspektrum mit Maxima bei 330 nm (Bande I) und 287 nm (Bande II).
- NaOMe: Bei sofortiger Messung nach Reagenz-Zugabe änderte sich das Spektrum im Vergleich zur methanolischen Lösung nur wenig. Nach 5 Minuten war jedoch eine drastische Verschiebung der Bande I zu erkennen (s. Abb. 38). Sie erschien jetzt als breites Maximum bei 415 nm und nahm bei jeder Messung an Intensität zu. Bande II zeigte keine Verschiebung, nahm aber beständig an Intensität ab. Verbindung 10 muß somit eine freie 4'- und eine veretherte 7-OH-Gruppe besitzen.
- NaOAc und NaOAc/H_3BO_3: Beide Spektren waren identisch mit dem Absorptionsspektrum der Substanz in Methanol.
- $AlCl_3$ und $AlCl_3$/HCl: Bathochrome Verschiebung beider Banden, wobei beide Spektren nahezu gleich sind. Verbindung 10 muß somit eine freie OH-Gruppe an C-5 besitzen.

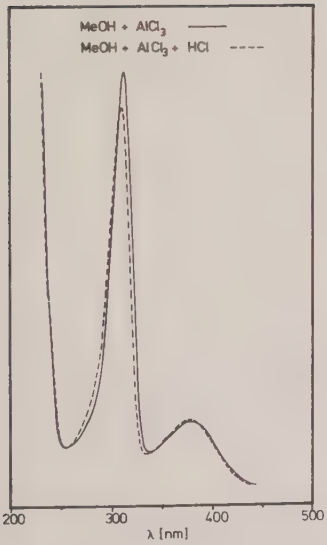
Aus den UV-Spektren geht hervor, daß 10 ein Flavanon ist, das zumindest an C-5 und C-4' eine freie Hydroxygruppe und an C-7 einen O-Alkylsubstituenten besitzen muß.

Das MS-Spektrum (Abb. 39) zeigt den Molekülpeak bei m/z 286. Demzufolge ist 10 ein Flavanon mit drei Substituenten: eine Methoxy- und zwei Hydroxygruppen. Die A-Ring-Fragmente bei m/z 193, 167 (Basispeak) und 166 weisen auf einen Ring mit je einer CH_3O- und OH-Gruppe hin. Das Auftreten des (B_3^+)-

Verbindung 10

MeOH	: 287, 330
NaOMe	: 288, 335 ----> 415
$AlCl_3$	: 311, 378
$AlCl_3$/HCl	: 308, 375
NaOAc	: 287, 330
NaOAc/H_3BO_3 (Proc. I)	: 287, 330





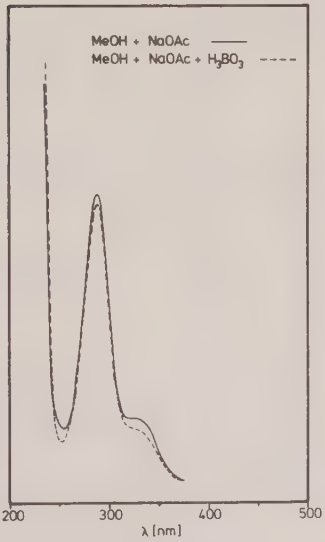


Abb. 38: UV-Spektren und λ_{max}-Werte [nm] von 10 (Abkürzungen nach [93])

Fragmentes (Erklärung der Fragmentbezeichnungen s. Abb. 30, S. 57) bei m/z 120 bestätigt die Anwesenheit einer Hydroxygruppe im Ring B.

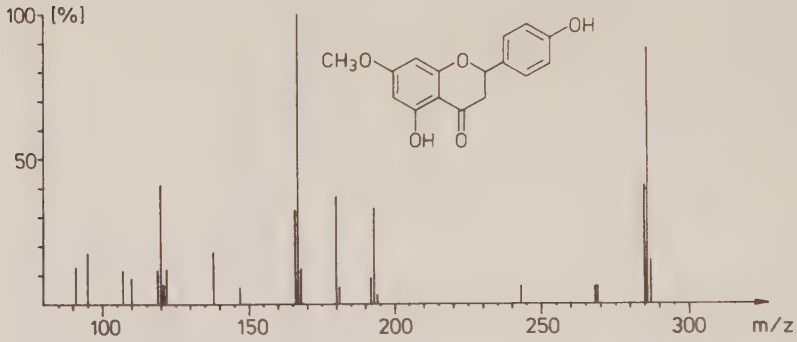


Abb. 39: MS-Spektrum von 10

Im IR-Spektrum (Abb. 40) ist das Signal für Hydroxygruppen zu erkennen. Im C=C-Bereich des Spektrums findet man eine Absorptionsbande bei 1640 cm^{-1}. Bei 1570 und 1518 cm^{-1} liegen Aromatenbanden. Die 1,4-Disubstitution eines Aromaten wird durch das Auftreten der Absorptionsbande bei 835 cm^{-1} belegt.

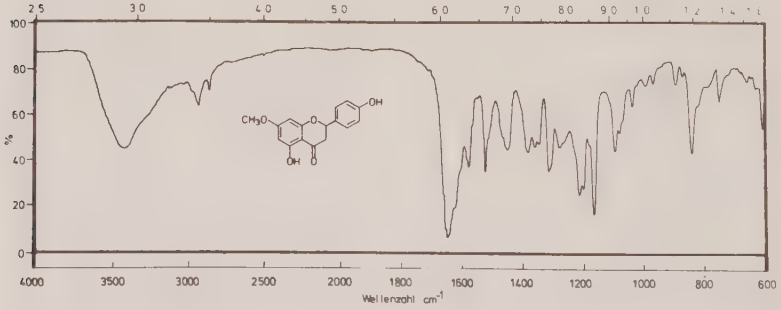


Abb. 40: IR-Spektrum von 10

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 41) bestätigt die aus den UV-, MS- und IR-Daten ableitbare Struktur von 10 als 7-Methylether vom Naringenin. Die ^{1}H-NMR-Daten sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

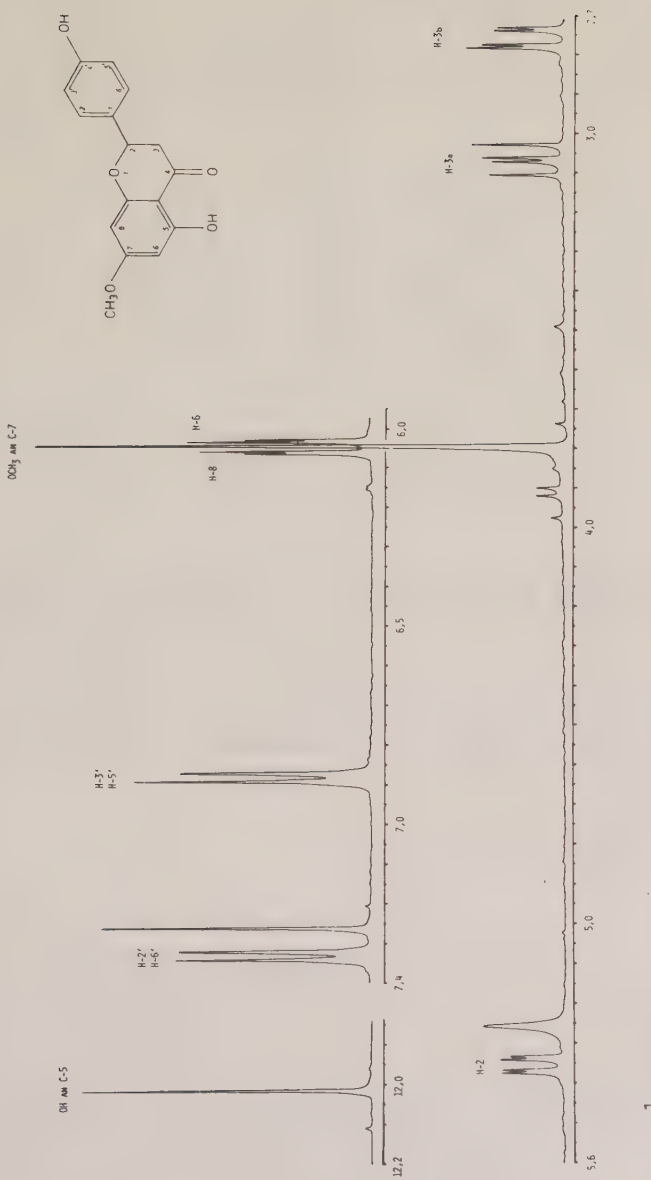


Abb. 41: ^{1}H-NMR-Spektrum von 10; δ (ppm)

Tab. 11: ^{1}H-NMR-Daten von 10 (Sakuranetin); gemessen bei 400 MHz in $CDCl_3$

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
2	5.355	dd	2,3a	13
3a	3.073	dd	2,3b	3
3b	2.760	dd	3a,3b	17
6	6.035	d	6,8	2
8	6.065	d		
2'/6'	7.330	d	2',3'	9
3'/5'	6.880	d	5',6'	9
CH_3O- an C-7	3.793	s		
OH- an C-5	12.010	s		
	5.255*	s		

* Das breite Singulett bei δ = 5.255 ppm ist vermutlich das Resonanzsignal der 4'-Hydroxygruppe.

In der Literatur wird für die unter dem Namen Sakuranetin beschriebene Verbindung ein Schmelzpunkt von 155°C angegeben [180]. Die isolierte Verbindung 10 schmolz bei 152-154°C.

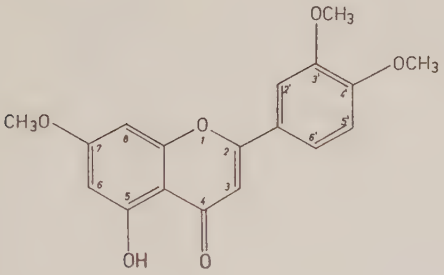
Sakuranetin ist in der Familie der Asteraceen verbreitet [180-183] und u.a. auch in Polypodiaceen [170], Betulaceen [150], einer Juglandaceae und einer Rosaceae [63] gefunden worden.

4.5. Isolierung von 11 und 12

Im aus Fraktion SF I/4 gewonnenen gelben Niederschlag (s. Kap. 4.4., S. 61) ließen sich dc zwei Verbindungen (11 und 12) nachweisen, die nach Besprühen mit NA-Reagenz gelb fluoreszierten. Verbindung 11 hatte im DC-System 6 mit 0,73 den gleichen R_f-Wert wie 6, unterschied sich aber mit R_f = 0,33 im System 2 sehr stark von dem Apigenin-7,4'-dimethylether (R_f = 0,60). Nach Trennung der Substanzen über eine präparative DC im System 6 und üblicher Aufarbeitung (s. Kap. 12.4.2.) konnte 11 in blaßgelben Nadeln (Schmp.: 162-163°C) und 12 als gelbes Pulver (Schmp.: 222,5-224°C) gewonnen werden. Auf-

grund der präparativen Ausbeute (0,05 % des Drogentrockengewichtes) handelt es sich bei 12 um die Hauptkomponente der Flavonoid-Fraktion.

4.5.1. Identifizierung von 11 (Luteolin-7,3',4'-trimethylether)



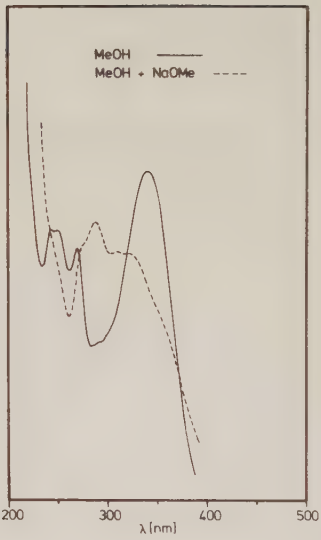
Luteolin-7,3',4'-trimethylether

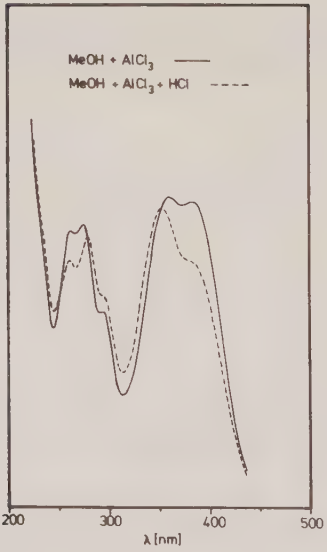
Den UV-Spektren (Abb. 42), die unter Zusatz von Verschiebungsreagenzien aufgenommen wurden ([92,93], s. auch Erklärungen zu den UV-Spektren von 6), konnten folgende Strukturhinweise entnommen werden:

- MeOH: Die Absorptionskurve deutet auf ein Flavon oder ein 3-OMe-Flavonol hin. Sie zeigt ein Maximum bei 340 nm. Bande II spaltet in zwei Peaks bei 250 und 243 nm auf, was charakteristisch für einen 3',4'-disubstituierten B-Ring ist [93,130].
- NaOMe: Keine Verschiebung der Maxima, d.h., keine freien 7- und 4'-Hydroxygruppen.
- NaOAc und NaOAc/H_3BO_3: Beide Spektren zeigten jeweils fast den gleichen Kurvenverlauf wie die methanolische Flavonoidlösung.
- $AlCl_3$ und $AlCl_3$/HCl: Bathochrome Verschiebung der Bande I um 46 bzw. 45 nm, mit charakteristischer Aufspaltung der Bande I. Die Form der Kurven und die jeweilige Lage des Maximums Ia sind charakteristisch für eine 5-OH-Gruppe und schließen eine 6- oder 8-C- bzw. O-Substitution aus [130]. Nach Voirin [130] kann aus den Absorptionsmaxima IIa (293-

Verbindung 11

MeOH	: 243, 250, 269, 340
NaOMe	: 272, 287, 334 sh
$AlCl_3$	: 262, 275, 295, 358, 386
$AlCl_3$/HCl	: 260, 278, 296, 352, 385
NaOAc	: 252, 270, 340
NaOAc/H_3BO_3 (Proc. I)	: 253, 269, 340





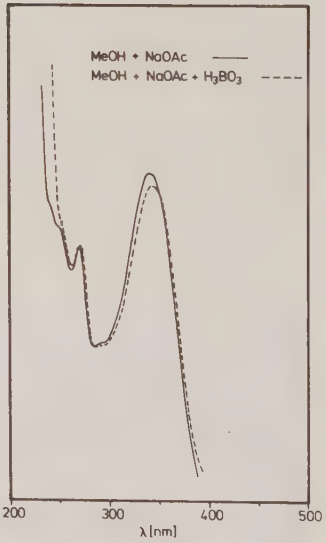


Abb. 42: UV-Spektren und λ_{max}-Werte [nm] von 11 (vgl. [184]; Abkürzungen nach [93])

296 nm) und der Doppelbande IIb (276-279 und 259-264 nm) in saurer Lösung auf einen disubstituierten B-Ring geschlossen werden. Da bei 11 die Bande IIa bei 296 nm und die Bande IIb als Aufspaltung bei 278 und 260 nm auftritt, kann ein 3',4'-Substitutionsmuster im Ring B als sicher angenommen werden.

Nach den UV-Daten muß es sich bei 11 um ein Flavon mit freier 5-OH-Gruppe und einem 3',4'-disubstituierten B-Ring handeln. In 7- und in 4'-Stellung sowie vermutlich auch in 3'-Stellung befinden sich keine freien Hydroxygruppen. Da das Verhältnis der Bande I/II größer als 1 ist und Substituenten an C-6 und C-8 ausgeschlossen werden können, muß 11 die Grundstruktur eines Flavons besitzen.

Im MS-Spektrum (Abb. 43) bildet der Molekülpeak bei m/z 328 den Basispeak. Die sich daraus ergebende Summenformel $C_{18}H_{16}O_8$ bestätigt das Vorliegen eines Flavons mit einer Hydroxy- und drei Methoxygruppen. Die A-Ring-Fragmente treten in Übereinstimmung mit 6-10 bei m/z 166 und 167 auf (Erklärung der Fragmentbezeichnung s. Abb. 21, S. 43), der damit Träger einer OH- und einer OCH_3-Gruppe ist. Somit müssen die beiden weiteren Methoxygruppen im B-Ring lokalisiert sein, was durch die Folgefragmente bei m/z 162 (B_1^+) und 165 (B_2^+) bestätigt wird. Die Bruchstücke bei m/z 150 und 147 sind durch CH_3-Abspaltung aus den B_2- und B_1-Fragmenten entstanden.

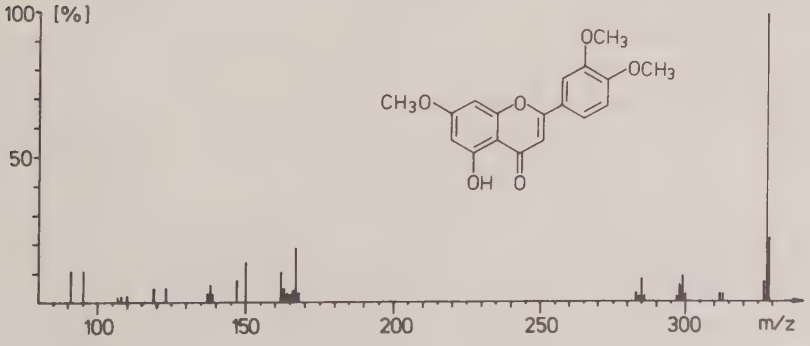


Abb. 43: MS-Spektrum von 11

Das IR-Spektrum (Abb. 44) von 11 zeigt neben den Aromatenbanden bei 1515 und 1500 cm^{-1} die C-O-Valenzschwingung eines Arylalkylethers bei 1255 cm^{-1}. Bei 3430 cm^{-1} findet man die Absorptionsbande einer assoziierten Hydroxygruppe. Die Signale bei 1660 und 1610 cm^{-1} deuten auf ein Flavon hin, während eine Bande bei 835 cm^{-1} für die 1,3,4-Trisubstitution eines Aromaten spricht.

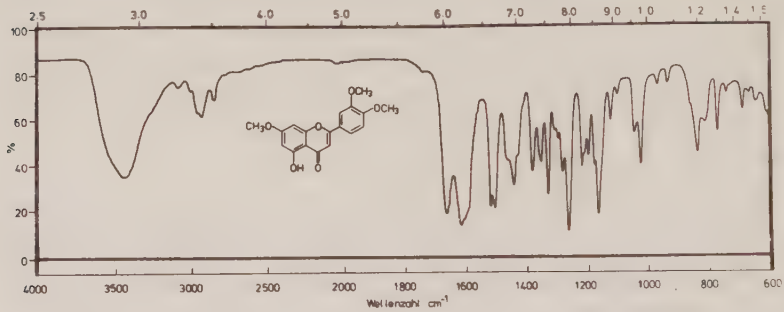


Abb. 44: IR-Spektrum von 11

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 45) bestätigt die bisherigen Ergebnisse. Bei δ = 12.783 ppm tritt das Proton der OH-Gruppe an C-5 in Resonanz. Im Bereich der chemischen Verschiebung für am Aromaten lokalisierte Methoxygruppen liegen drei Singuletts. Zwei Dubletts mit meta-koppelnden Protonen sind im Aromatenbereich bei δ = 6.359 ppm (H-6) und δ = 6.483 ppm (H-8) zu finden. Das Singulett bei δ = 6.575 ppm ist dem Proton H-3 zuzuschreiben und bestätigt die Flavonstruktur. Die B-Ring-Protonen zeigen im tieferen Feld eine AMX-Aufspaltung mit Resonanzsignalen bei δ = 6.970 (H-5'), 7.323 (H-2') und 7.511 ppm (H-6'). Die vollständigen ^{1}H-NMR-Daten mit den Kopplungskonstanten sind der Tabelle 12 zu entnehmen.

Die UV-, MS-, IR- und ^{1}H-NMR-Daten weisen 11 als Luteolin-7,3',4'-trimethylether aus, der hier erstmalig in der Gattung Arnica nachgewiesen wurde.

Das natürliche Vorkommen dieser Substanz ist bereits 1970 von Dhar et al. in den Früchten von Piper peepuloides [152] beschrieben worden. Außerdem konnte sie in einer Asteraceae

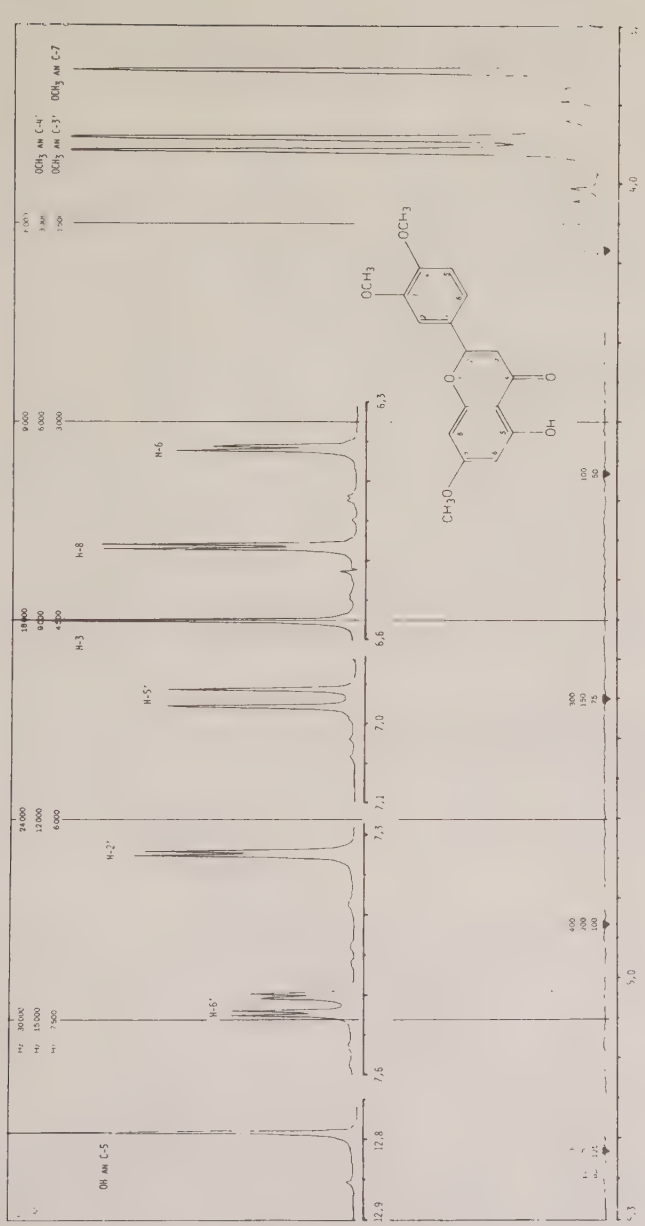


Abb. 45: ^{1}H-NMR-Spektrum von 11; δ (ppm)

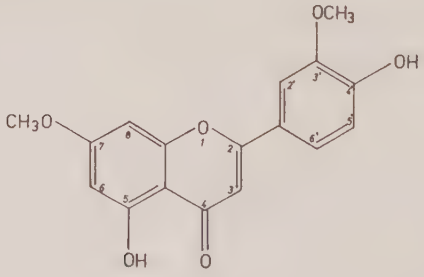
Tab. 12: ^{1}H-NMR-Daten von 11 (Luteolin-7,3',4'-trimethylether); gemessen bei 400 MHz in $CDCl_3$, in Klammern Literaturwerte nach [152], (keine Lsm.-Angabe)

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
3	6.575 (6.60)	s		
6	6.359 (6.39)	d	6,8	2.5 (2.5)
8	6.483 (6.51)	d		
2'	7.323 (7.34)	d	2',6'	2.0 (2)
5'	6.970 (6.98)	d	5',6'	8.5 (- -)
6'	7.511 (7.54)	dd		
CH_3O- an C-7	3.856 (3.82)*	s		
CH_3O- an C-3'	3.941* (3.9)*	s		
CH_3O- an C-4'	3.956* (4.0)*	s		
OH- an C-5	12.793 (12.72)	s		

* Zuordnung vertauschbar

[156], einer Lamiaceae [185], in Betula nigra [63] sowie in Turnera diffusa [186] und in Cistus clusii [157] nachgewiesen werden.

4.5.2. Identifizierung von 12 (Velutin)



Velutin

Die UV-Analyse (s. Abb. 46) unter Verwendung verschiedener Shift-Reagenzien ([92,93] s. auch 6) ergab Hinweise auf folgende Strukturmerkmale:

- MeOH: Flavon- oder 3-OMe-Flavonol-Grundstruktur mit Maxima bei 345 nm (Bande I), 269, 250 und 243 nm. Die Peakaufspaltung der Bande II läßt einen B-Ring mit 3',4'-Substitution erwarten. Das Verhältnis der Bande I/II ist größer als 1.

- NaOMe: Starke bathochrome Verschiebung der Bande I um 59 nm verbunden mit einer Intensitätssteigerung, d.h., es muß eine 4'-OH-Gruppe im Molekül vorhanden sein. Die Schulter auf der langwelligen Seite der Bande II (bei 300 nm) zeigt eine veretherte 7-Hydroxygruppe an [127].

- NaOAc: Das fast identische Spektrum wie auf NaOMe-Zugabe ist auf die Verwendung von Essigsäure-freiem Natriumacetat zurückzuführen [93].

- $NaOAc/H_3BO_3$: Das Spektrum ähnelt der Absorptionskurve der methanolischen Flavonoidlösung. Vicinale Hydroxygruppen sind dadurch ausgeschlossen.

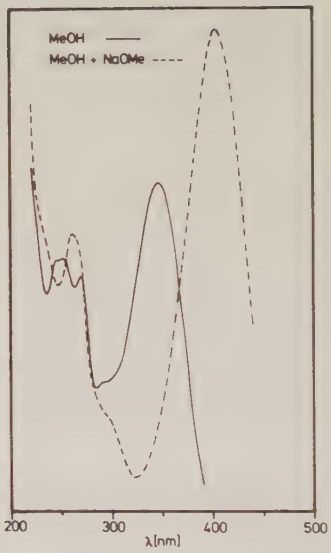
- $AlCl_3$ und $AlCl_3/HCl$: Bande I wird um 45 bzw. 41 nm in den längerwelligen Bereich des Spektrums verschoben, bei gleichzeitiger Aufspaltung der Bande I. Somit muß 12 eine freie 5-OH-Gruppe besitzen, bei Abwesenheit eines 6-OH/OR-Substituenten. Weiterhin können durch die Form und die Lage der jeweiligen Maxima 6-C- und 8-C- bzw. O-Substituenten ausgeschlossen werden. Die Absorptionsmaxima der Bande II (mit Aufspaltung der Bande IIb) in saurer $AlCl_3$-Lösung bei 296, 277 und 262 nm (s. auch 11) deuten auf den disubstituierten B-Ring hin.

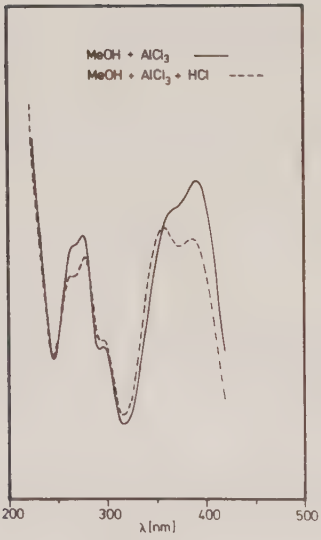
Als Ergebnis der UV-Analyse ergibt sich, daß es sich bei 12 um ein Flavon mit Hydroxygruppen an C-5 und C-4' handelt, das darüber hinaus in 7- und 3'-Stellung O-Alkylgruppen trägt.

Das Massenspektrum von 12 (Abb. 47) zeigt ein für Flavone typisches Fragmentierungsmuster (s. auch Abb. 21, S. 43) mit einem Molekülpeak (Basispeak) bei m/z 314 und Folgefragmenten bei m/z 166 (A_1^+) und 167 (A_1+H^+) sowie 148 (B_1^+) und 151 (B_2^+). Die Bruchstücke bei m/z 133 und 136 sind durch CH_3-Abspaltung aus den B_1- und B_2-Fragmenten entstanden. Aus dem

Verbindung 12

MeOH	: 243, 250, 269, 345
NaOMe	: 261, 300 sh, 404
$AlCl_3$	: 264, 275, 297, 365, 390
$AlCl_3$/HCl	: 262, 277, 296, 357, 386
NaOAc	: 259, 267 sh, 297 sh, 405
NaOAc/H_3BO_3 (Proc. I)	: 253, 269, 348





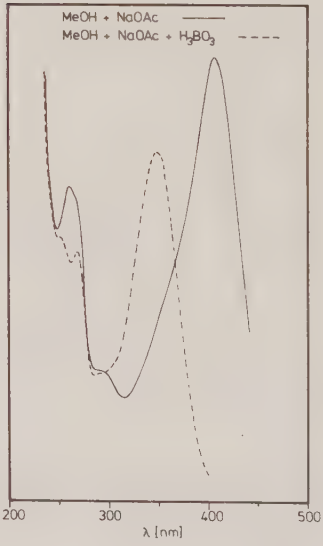


Abb. 46: UV-Spektren und λ_{max}-Werte [nm] von 12 (vgl. [159]; Abkürzungen nach [93])

Molekülpeak und der Fragmentfolge ergibt sich, daß der A- und B-Ring des Flavons jeweils mit einer Hydroxy- und einer Methoxygruppe substituiert ist.

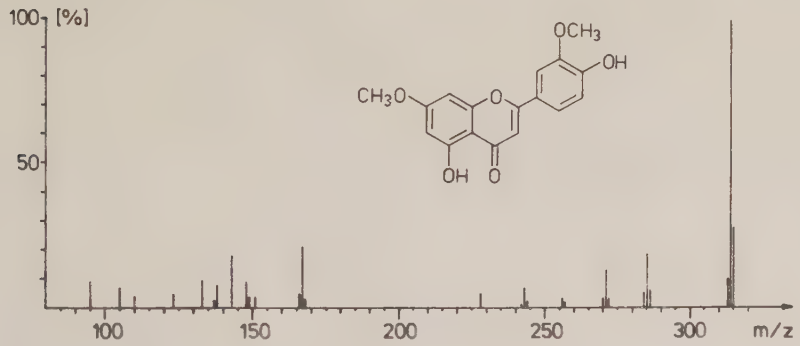


Abb. 47: MS-Spektrum von 12

Im IR-Spektrum (Abb. 48) findet man charakteristische Banden bei 3400 (OH), 1660 (α,β-ungesättigte C=O-Verbindung) und 1605 cm^{-1}, die das Vorliegen eines Flavons bestätigen. Die aromatische Struktur ist u.a. durch Absorptionsbanden bei 1500 und 1430 cm^{-1} gekennzeichnet. Das Signal eines Arylalkylethers erscheint bei 1260 cm^{-1}.

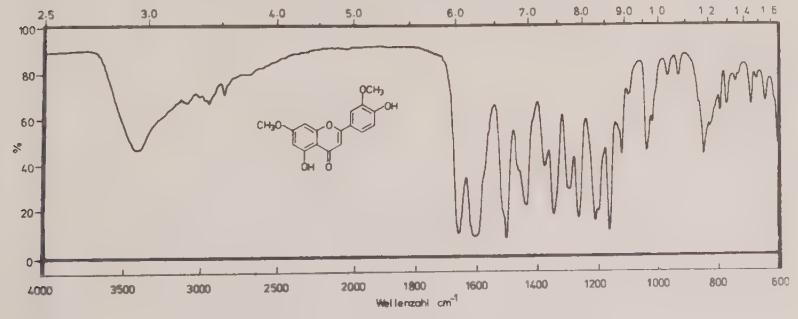


Abb. 48: IR-Spektrum von 12

Die ^{1}H-NMR-Daten (s. Abb. 49 und Tab. 13) stehen in vollem Einklang mit den bisherigen Ergebnissen und bestätigen die Struktur von 12 als Luteolin-7,3'-dimethylether (= Velutin).

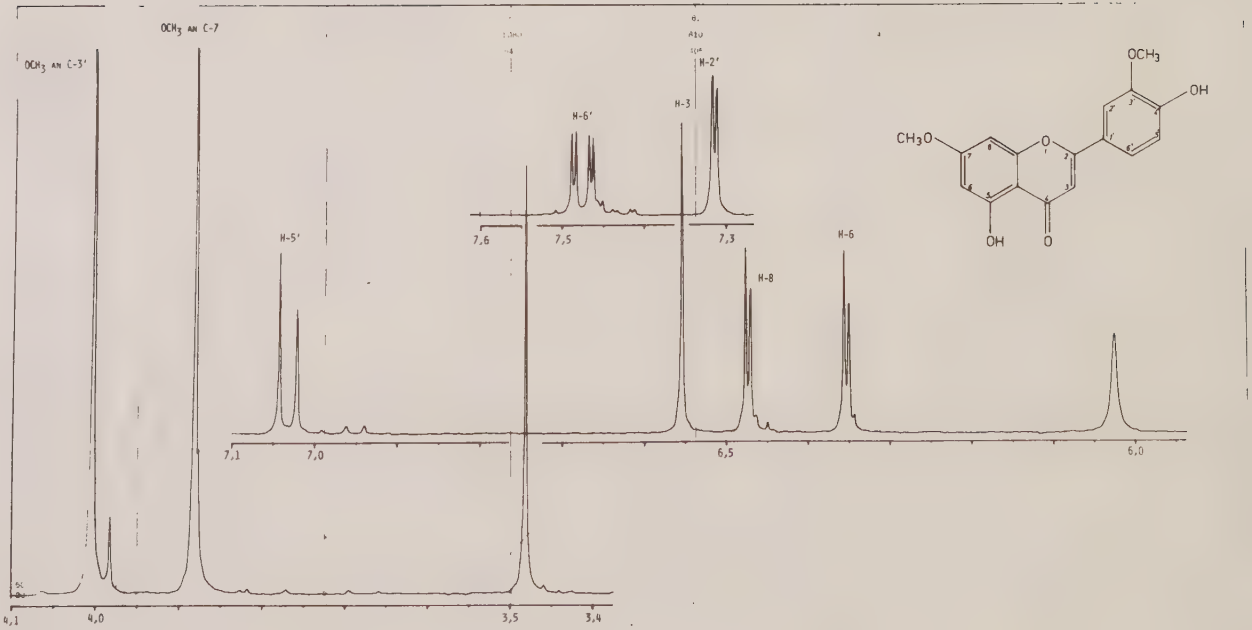


Abb. 49: ^{1}H-NMR-Spektrum von 12; δ (ppm)

Tab. 13: ^{1}H-NMR-Daten von 12 (Velutin); gemessen bei 400 MHz in $CDCl_3$, in Klammern die Daten des Diacetats

Protonen	δ (ppm)		Multiplizität	Protonen	J [Hz]
3	6.555	(6.548)	s		
6	6.353	(6.518)	d	6,8	2.5
8	6.474	(6.866)	d		
2'	7.314	(7.378)	d	2',6'	2.0
5'	7.033	(7.168)	d	5',6'	8.5
6'	7.475	(7.464)	dd		
CH_3O- an C-7	3.881	(3.920)	s		
CH_3O- an C-3'	4.005	(3.928)	s		
CH_3- von OAc	---	(2.440)	s		
CH_3- von OAc	---	(2.348)	s		
OH- an C-4'	6.026*	(---)	s(br)		

* Das breite Singulett bei δ = 6.026 ist vermutlich das Resonanzsignal des Protons der 4'-Hydroxygruppe.

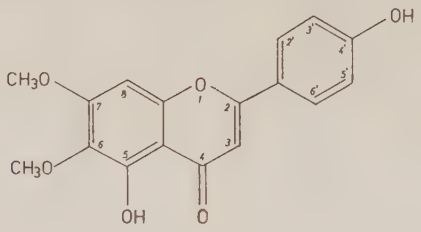
Der Schmelzpunkt lag bei 222,5-224°C (Velutin nach [178]: 225°C).

Da ein direkter Vergleich mit authentischem Velutin nicht möglich war, wurde das Diacetat von 12 hergestellt (s. Kap. 12.6.1.). Schmelzpunkt, MS- und IR-Daten dieses Derivats stimmten vollständig mit den Literaturwerten für Velutindiacetat überein (Daten s. Kap. 12.9.6.). Im ^{1}H-NMR-Spektrum zeigen die B-Ring-Protonen des Diacetates die gleichen chemischen Verschiebungsdifferenzen wie sie bei einem Flavonoid mit 3'-OCH_3- und 4'-OH-Substitution beobachtet wurden [187].

Der zusätzlich durchgeführte UV-Vergleich mit dem isomeren Luteolin-7,4'-dimethylether (Pilloin) zeigte erwartungsgemäß keine Übereinstimmung.

Velutin ist als Inhaltsstoff der Gattung Arnica bis jetzt noch nicht beschrieben worden. Es wurde von Das et al. [188] erstmals aus den Blättern von Ceanothus velutinus (Rhamnaceae) isoliert und seither auch in der Familie der Asteraceae [63, 189], Cistaceae [157], Eupomatiaceae [167], Polypodiaceae [170], Winteraceae [190] und Zygophyllaceae [159] nachgewiesen.

4.6. Isolierung und Identifizierung von 13 (Cirsimaritin)



Cirsimaritin

In Fraktion SF I/5 lag 13 neben Spuren von 7 als Hauptkomponente vor. Die Trennung beider Substanzen gelang über präparative DC im System 6. Nach der üblichen Aufarbeitung (s. Kap. 12.4.2.) lag 13 dc rein vor. Trotz mehrerer Kristallisationsversuche mit verschiedenen Lösungsmitteln konnte sie jedoch nicht kristallin erhalten werden.

Mit einem R_f-Wert von 0,39 war 13 die polarste Komponente der Flavonoid-Gesamtfraktion. Nach Detektion mit Naturstoffreagenz A erschien sie bei Betrachtung bei 366 nm nicht wie 6, 7, 11 und 12 als gelbe bis gelbgrüne fluoreszierende Zone, sondern zeigte Fluoreszenzlöschung, was nach Wollenweber [125] auf Flavone mit Substituenten an C-6 und/oder C-8 hinweisen soll.

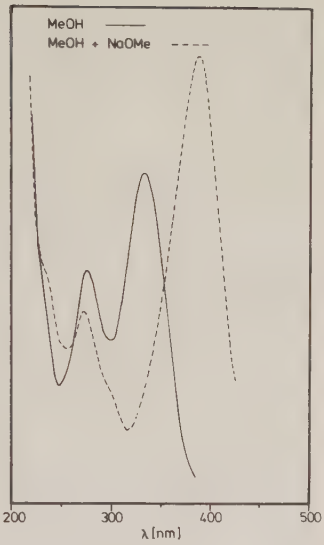
Die UV-Spektren (Abb. 50) von 13 unter Zusatz von Verschiebungsreagenzien [92,93] ergaben folgende Strukturhinweise:

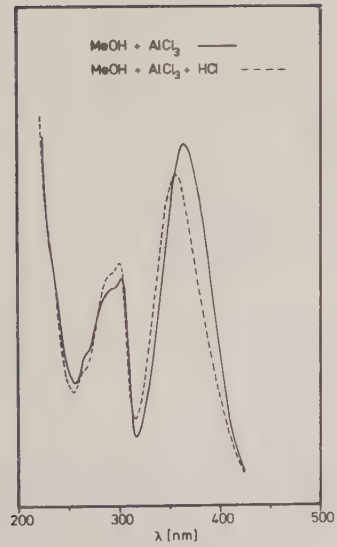
- MeOH: Die Substanz zeigt zwei Maxima bei 334 nm (Bande I) und 276 nm (Bande II). Die Absorptionskurve deutet auf ein Flavon bzw. 3-OMe-Flavonol hin. Bereits die gegenüber 6, 7, 11 und 12 um 7 nm in den längerwelligen Bereich verschobene Bande II läßt die Einführung von mindestens einer weiteren Sauerstoffunktion in den Ring A erkennen.
- NaOMe: Bande I erfährt unter Intensitätszunahme eine Rotverschiebung von 52 nm und weist damit auf eine freie 4'-OH-Gruppe hin. Die Schulter auf der langwelligen Seite der Bande II kennzeichnet nach Bacon [127] eine veretherte Hydroxygruppe an C-7.

Verbindung 13

MeOH	: 276, 334
NaOMe	: 273, 302 sh, 386
$AlCl_3$	: 265 sh, 285 sh, 302, 364
$AlCl_3$/HCl	: 264 sh, 287 sh, 300, 356
NaOAc	: 273, 300 sh, 387
NaOAc/H_3BO_3	: 276, 337

(Proc. I)





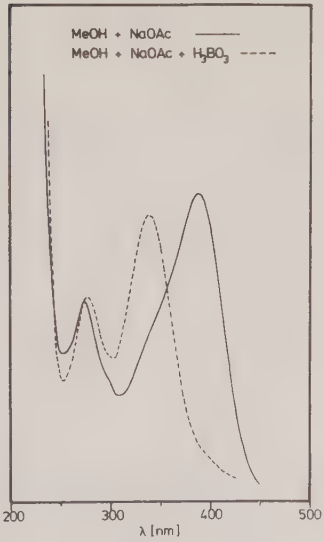


Abb. 50: UV-Spektren und λ_{max}-Werte [nm] von 13 (vgl. [192]; Abkürzungen nach [93])

- NaOAc: Das Spektrum bestätigt das Vorliegen einer freien 4'-Hydroxygruppe sowie einer O-Alkylgruppe an C-7.

- $NaOAc/H_3BO_3$: Im Molekül sind keine o-Dihydroxygruppen enthalten.

- $AlCl_3$: Bande I wird bathochrom um 30 nm verschoben. Da keine Peakaufspaltung erfolgt, ist die 6- und/oder 8-Position substituiert, die 5-OH-Gruppe liegt frei vor.

- $AlCl_3/HCl$: Bande I wird im Vergleich zum MeOH-Spektrum um 21 nm verschoben und liegt damit innerhalb des von Sakakibara [191] beschriebenen Bereichs von 16-23 nm, der eine 5-OH-, 6-OMe-Substitution kennzeichnet. Dieses Substitutionsmuster wird nach Voirin [130] durch den unter 381 nm bleibenden Shift der Bande I bestätigt und schließt gleichzeitig auch die Struktur eines 3-OMe-Flavonols aus (Absorption der Bande Ia zwischen 400-414 nm). 6-OH-Derivate zeigen Verschiebungswerte von 25-30 nm [191] und können darüber hinaus durch die Lage des Maximums der Bande II in methanolischer Lösung (284-286 nm [130]) erkannt werden. Die fehlende Peakaufspaltung oder Schulterbildung auf der langwelligen Seite des Maximums der Bande I zeigt das unsubstituierte Vorliegen der C-8-Position an und schließt gleichzeitig einen nicht etherartig gebundenen Substituenten an C-6 aus. Charakteristisch für ein 4'-monosubstituiertes B-Ring-Derivat ist das Auftreten der Bande II zwischen 301-303 nm (13: 300 nm) in saurer $AlCl_3$-Lösung mit Schulterandeutungen bei ca. 262 und 291 nm (s. Abb. 50) sowohl in neutraler als auch in saurer $AlCl_3$-Lösung [130].

Nach diesen Ergebnissen sollte es sich bei 13 um ein 6,7-di-O-alkyliertes Flavon mit freien Hydroxygruppen an C-5 und C-4' handeln.

Verbindung 13 zeigt im MS-Spektrum (Abb. 52) einen Molekülpeak bei m/z 314, der gleichzeitig Basispeak ist und im Einklang mit einem Flavon steht, das zwei Methoxy- und zwei freie Hydroxygruppen besitzt. Das intensive Folgefragment bei m/z 299 resultiert aus der Abspaltung einer Methylgruppe aus dem Molekül und ist typisch für in Stellung 6 oder 8 methoxylierte Flavonoide. Bei 8-OMe-Flavonoiden ist diese Fragmentierung im

Vergleich zu den 6-methoxylierten Flavonoiden stark bevorzugt, so daß bei diesen das Fragment (M^+-CH_3) den Basispeak bildet [139,140]. Abbildung 51 zeigt diese bevorzugte Fragmentierung eines 6-OMe-Flavons. Im Spektrum von 13 findet sich bei m/z 271 das so gebildete (M^+-Me-CO)-Bruchstück.

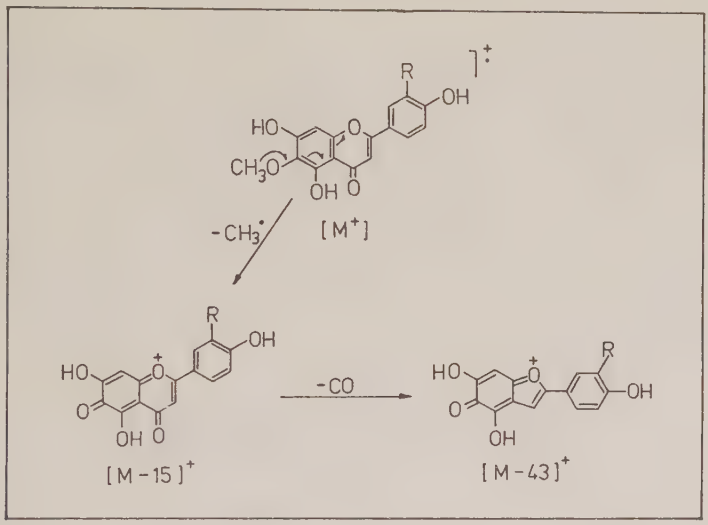


Abb. 51: Schema der bevorzugten Fragmentierung eines 6-OCH_3-Flavonoids am Beispiel des Hispidulins (nach [137])

Das A_1-Fragment selbst kann als Bruchstück demzufolge im Spektrum nicht auftreten, jedoch kennzeichnen die Folgefragmente

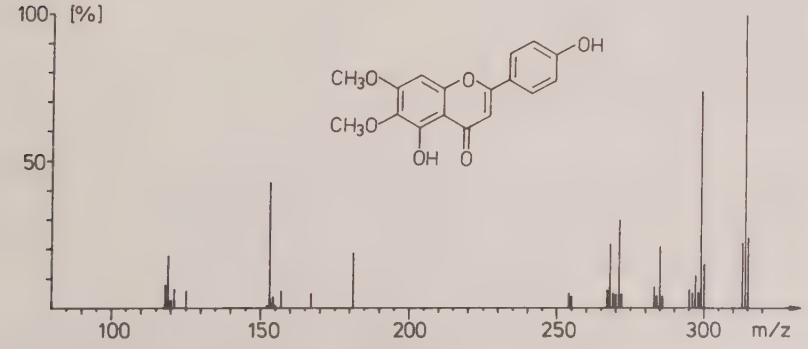


Abb. 52: MS-Spektrum von 13

bei m/z 181 (A_1^+-CH_3) und 153 (A_1^+-CH_3-CO) den A-Ring als Träger zweier Methoxy- und einer Hydroxygruppe. Entsprechend der Summenformel $C_{17}H_{14}O_6$ kann der Ring B nur noch eine freie OH-Gruppe besitzen, was durch die Bruchstücke bei m/z 121 (B_2^+) und 118 (B_1^+) bestätigt wird (Erklärung der Fragmentbezeichnung s. Abb. 21).

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 53) von 13 findet man zwei Dubletts für die B-Ring-Protonen im tieferen Feld. Die darüber hinaus im Spektrum erscheinenden Singuletts bei δ = 6.603 und 6.570 ppm können den Protonen H-8 und H-3 zugeordnet werden, während die bei δ = 3.985 und 3.946 ppm auftretenden Signale typisch sind für am Aromaten lokalisierte Methoxygruppen. Die Signale, die im Spektrum im Bereich bis 2 ppm auftreten, gehören nicht zur Substanz, sondern werden durch Verunreinigungen hervorgerufen. Die ^{1}H-NMR-Daten sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

Tab. 14: ^{1}H-NMR-Daten von 13 (Cirsimaritin); gemessen bei 360 MHz in $CDCl_3$, in Klammern Literaturwerte nach [193]

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen J [Hz]
3	6.570 (6.56)	s	
8	6.603 (6.60)	s	
2'/6'	7.842 (7.82)	d	2',3' 9 (9)
3'/5'	6.993 (6.98)	d	5',6' 9 (9)
CH_3O- an C-6	3.946* (3.93)*	s	
CH_3O- an C-7	3.985* (3.97)*	s	

* Zuordnung vertauschbar

Bei 13 handelt es sich damit eindeutig um Cirsimaritin, das in allen spektralen Daten vollständig identisch mit der authentischen Vergleichssubstanz** war und auch unter der Bezeichnung

---

** Herrn Prof. Dr. C.H. Brieskorn, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, danke ich für die Überlassung einer Probe von Cirsimaritin.

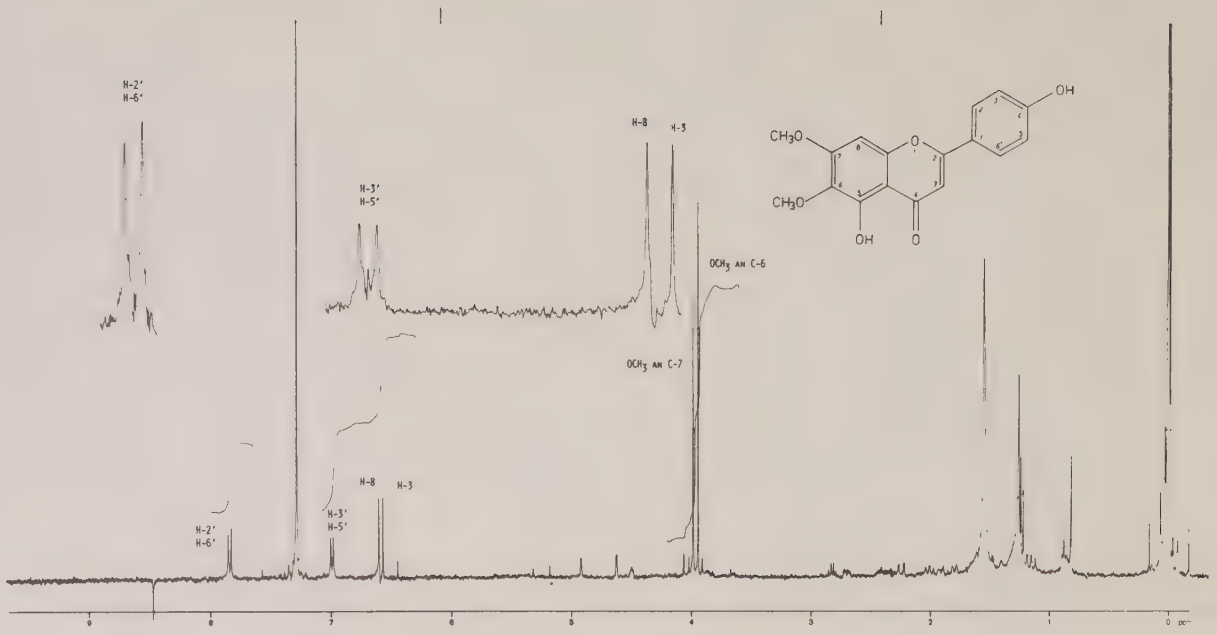


Abb. 53: ^{1}H-NMR-Spektrum von 13; δ (ppm)

6-Methoxygenkwanin oder auch Scrophulein bereits beschrieben ist.

Cirsimaritin wurde bisher hauptsächlich in Lamiaceen- [155, 193-197] und Asteraceen-Arten [132,172,192,198-200] gefunden. Wollenweber berichtete 1977 erstmals über das Vorkommen dieser Verbindung in Betula nigra [201]. Weiterhin konnte sie in einer Digitalis- [202] und einer Phacelia-Art [203] nachgewiesen werden.

5. SESQUITERPENLACTONE UND FLAVONOIDE DER BLÜTENKÖRBCHEN VON ARNICA VISCOSA

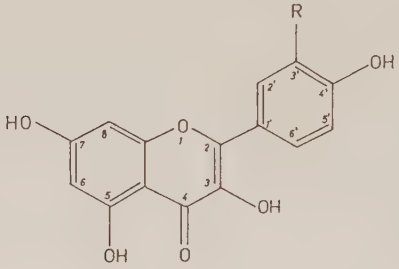
Bei den bisherigen Inhaltsstoff-Analysen von Arnica-Arten wurden - ausgehend von der Suche nach einer gleichwertigen Austauschdroge für die von A. montana stammenden "Flores Arnicae" - vielfach nur die Blütenkörbchen analysiert. Um bei einem chemotaxonomischen Vergleich der Sekundärstoffführung verschiedener Arnica-Arten eventuelle organspezifische Variationen ausschließen zu können, wurden nach dem blühenden Kraut auch 250 g gemahlene Blütenkörbchen von A. viscosa aufgearbeitet (s. Kap. 12.10.) und die Sl und Flavonoide dieses Organs allein analysiert.

Die nach Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 erhaltene Sesquiterpenlacton-Fraktion zeigte dc das Sl-Spektrum des aufgearbeiteten Krautes. Nach sc Auftrennung wurden die hierbei anfallenden Sl-haltigen Teilfraktionen direkt einer GC- und GC/MS-Analyse zugeführt. Auf diesem Weg wurden die in den Blütenkörbchen auftretenden Sl ebenfalls als Helenalin und 11α,13-Dihydrohelenalin sowie deren O-Acetylderivate identifiziert (1,2,4-15). Nicht nachgewiesen werden konnte das aus dem Kraut isolierte 2β-Hydroxy-6-O-acetyl-tetrahydrohelenalin (3).

Das Flavonoidspektrum der Blütenkörbchen erwies sich dc als komplexer zusammengesetzt als das des blühenden Krautes. Nach grober sc Trennung und dc Oberprüfung der Teilfraktionen in mehreren Systemen konnten jedoch dieselben Hauptkomponenten wie im Kraut nachgewiesen werden. Zur Bestätigung der DC-Ergebnisse wurden 6-13 jeweils in solchen Mengen isoliert (s. Kap. 12.10.3.), daß eine UV-Analyse mit den einzelnen Verschiebungsreagenzien [93] durchgeführt werden konnte. Auch dabei zeigten die isolierten Substanzen keine Unterschiede zu 6-13, so daß diese auch als Inhaltsstoffe der Blütenkörbchen anzusehen sind.

Daneben wurden in einigen Teilfraktionen noch weitere, meist in Spuren auftretende, Flavonoide nachgewiesen. Von diesen konnten lediglich zwei Verbindungen rein isoliert werden. Sie wurden über die Schmelzpunkte, die UV-, MS-, IR- und ^{1}H-NMR-

Daten (s. Kap. 12.10.4. und 12.10.5.) als die ubiquitär vorkommenden Flavonole Quercetin (14) und Kämpferol (15) identifiziert.



14: R = OH Quercetin
15: R = H Kämpferol

6. DAS ÄTHERISCHE ÖL DER RHIZOME, BLÄTTER UND BLÜTEN VON ARNICA VISCOSA

6.1. Gehaltsbestimmung

Der Gehalt an ätherischem Öl wurde mit der "Karlsruher Apparatur" bestimmt [204]. In den Rhizomen wurde 3,55 %, in den Blättern 0,14 % und in den Blüten 0,10 % ätherisches Öl gefunden. Der aufgrund des starken Drüsenbesatzes dieser Arnica-Art vermutete hohe Gehalt an ätherischem Öl ist somit nicht gegeben.

Das ätherische Öl der Blätter und Blütenkörbchen ist flüssig und leicht gelb gefärbt. Im Blütenöl fielen z.T. gelblich-weiße, feste Bestandteile an, bei denen es sich vermutlich um Fettsäuren handeln könnte [7,69]. Der Ölgehalt der Blüten entspricht dem der A. chamissonis-Blüten (nach [7]: 0,08-0,16 %) und ist niedriger als in den Blüten von Arnica montana (nach [205]: 0,24-0,27 %). Auch der Ölgehalt der Blätter ist wesentlich geringer als bei A. montana [33]. Das Rhizomöl hat eine kräftige gelbe Färbung und ist bei Zimmertemperatur vollständig flüssig. Mit 3,55 % weisen die Rhizome der A. viscosa einen ähnlich hohen Ölgehalt wie die von A. montana auf (nach [204]: 2,7-6,31 %). Sie führen damit deutlich mehr ätherisches Öl als die Rhizome von A. chamissonis (nach [7,204]: 0,45-1,18 %).

6.2. Gaschromatographische Auftrennung und DC-Analyse der ätherischen Öle

Eine erste Charakterisierung der ätherischen Öle erfolgte durch die gc Auftrennung an einer OV-101-Kapillarsäule (System 2). Sowohl das Rhizom- als auch das Blattöl wird von nur wenigen Verbindungen als Hauptkomponenten zusammengesetzt, die ca. 97 % bzw. 77 % des Gesamtöles ausmachen (s. Abb. 54).

Das Blütenöl ist dagegen wesentlich komponentenreicher, wobei drei Verbindungen etwa ein Drittel des Gesamtöls ausmachen und die restlichen Komponenten jeweils Anteile von ca.

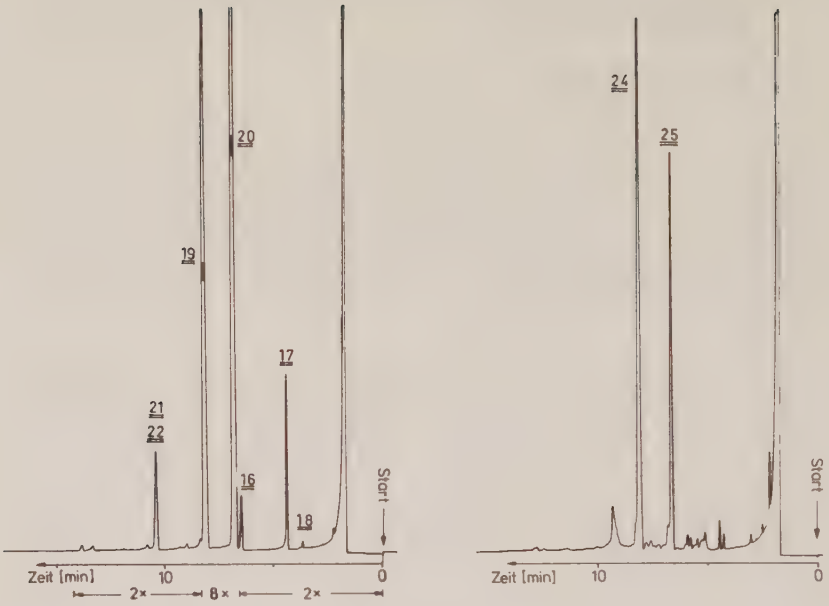


Abb. 54: Kapillargaschromatogramm an Siliconöl OV-101 (System 2) des ätherischen Öles der Rhizome (Abb. links) und der Blätter (Abb. rechts) von A. viscosa

0,5-1,5 % stellen. Diese unterschiedliche Zusammensetzung der drei ätherischen Öle geht auch aus der dc Auftrennung hervor, bei der zum Vergleich das Blütenöl von A. montana mitchromatographiert wurde (Abb. 55). Lediglich im Rhizomöl, nicht jedoch im Blatt- und Blütenöl von A. viscosa, ließ sich bereits hier Thymol nachweisen, das als Bestandteil des A. montana-Blütenöls bekannt ist [69].

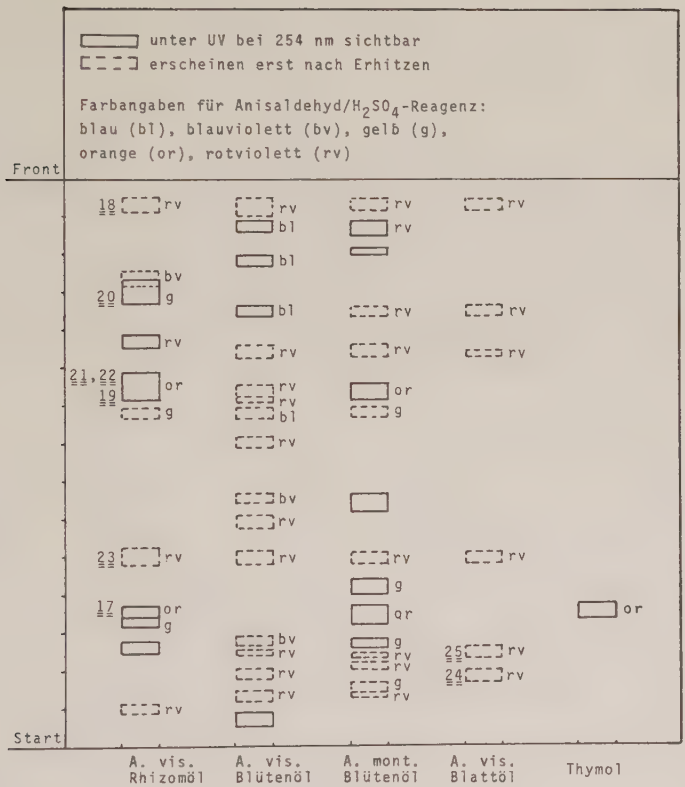


Abb. 55: DC des ätherischen Öles der Rhizome, Blätter und Blüten von A. viscosa im Vergleich zum Blütenöl von A. montana (DC-System 11)

6.3. Identifizierung der Hauptkomponenten des ätherischen Öles der Rhizome (16-22)

Die Identifizierung der Komponenten des Rhizomöls erfolgte durch GC-Analyse in mehreren Systemen und durch gekoppelte GC/MS-Analyse im System 5. Die Identität der jeweiligen Verbindungen wurde dabei durch Coinjektion der authentischen, z.T. synthetisierten, Vergleichssubstanzen (s. Kap. 12.5.) und durch Vergleich ihrer unter denselben Bedingungen gleich-

zeitig aufgenommenen Massenspektren zusätzlich sichergestellt. Danach handelt es sich bei den im Gaschromatogramm (Abb. 54) erscheinenden Peaks um folgende Verbindungen: Thymolmethylether (18), Thymol (17), nicht identifizierter Sesquiterpenkohlenwasserstoff (M^+ 204; 16), 6-Hydroxythymoldimethylether (20), Thymolisobuttersäureester (19), Thymol-2-methyl- und -3-methylbuttersäureester (= Isovaleriansäureester) (21 bzw. 22). Die beiden isomeren Methylbuttersäureester trennen sich an der OV-101-Säule nicht. Der n-Valeriansäureester kann aufgrund der längeren Retentionszeit ausgeschlossen werden. Eine Trennung von 21 und 22 gelingt jedoch an der Carbowax-20M-Säule (System 3), wie dies Abbildung 56 zeigt.

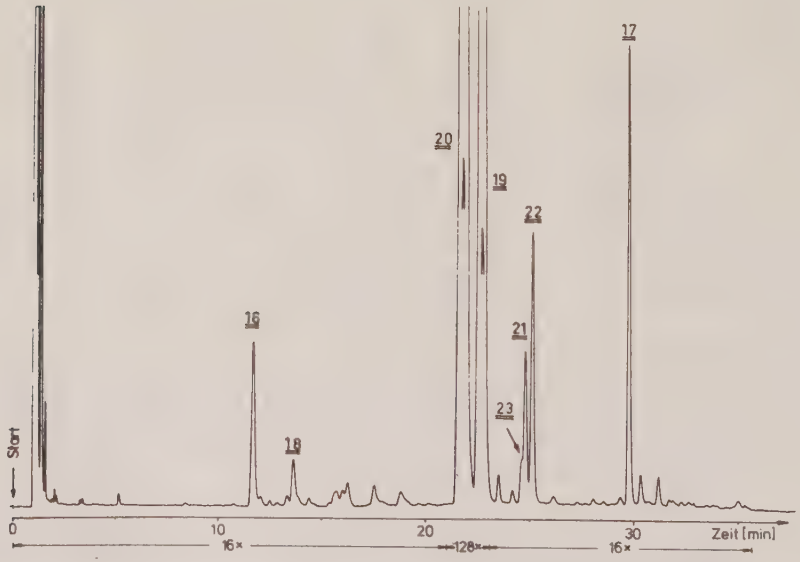
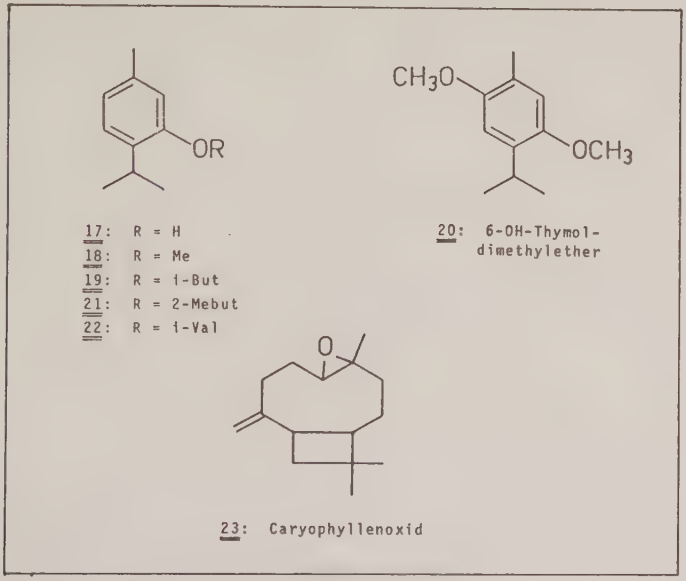


Abb. 56: Kapillargaschromatogramm an Carbowax-20M (System 3) des Rhizomöles von A. viscosa

Da es sich bei dem nicht identifizierten Sesquiterpenkohlenwasserstoff (M^+ 204) eventuell um die dünnschichtchromatographisch in allen drei ätherischen Ölen von A. viscosa nachweisbare Komponente mit dem R_f-Wert 0,34 handeln konnte (s.

Abb. 55, S. 95, rotviolette Zone oberhalb vom Thymol) wurde diese Verbindung durch präparative DC im System 11 isoliert (s. Kap. 12.12.2.). Das durch GC/MS-Kopplung aufgenommene Massenspektrum zeigte den Molekülpeak (M^+ 220) und das Fragmentierungsmuster von Caryophyllenoxid (23), was durch direkten Vergleich und weiteren dc und gc Vergleich in mehreren Systemen mit authentischem Caryophyllenoxid bestätigt wurde. Dieses Sesquiterpen ist kürzlich auch im ätherischen Öl der Blüten von Arnica montana nachgewiesen worden ([71,206], s. auch Abb. 55, S. 95). Von dem nicht identifizierten Sesquiterpenkohlenwasserstoff unterschied es sich nicht nur durch das Massenspektrum, sondern auch durch die Retentionszeit im GC (s. Abb. 56).



17: R = H
18: R = Me
19: R = i-But
21: R = 2-Mebut
22: R = i-Val

20: 6-OH-Thymol-dimethylether

23: Caryophyllenoxid

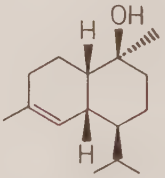
Abb. 57: Identifizierte Bestandteile des ätherischen Öles der Rhizome von Arnica viscosa

In Abbildung 57 sind die Strukturformeln der identifizierten Komponenten des ätherischen Öles der Rhizome wiedergegeben. Hauptkomponenten sind 19 und 20, die etwa 90 % des ätherischen Öles stellen.

Die analytischen Daten von 16-23 finden sich im Exp. Teil (Kap. 12.12.).

6.4. GC- und GC/MS-Analyse des ätherischen Öls der Blätter und Blütenkörbchen

Die unter GC/MS-Kopplung aufgenommenen Massenspektren der beiden Hauptkomponenten des Blattöls (GC s. Abb. 54, S. 94) ließen darauf schließen, daß es sich bei den beiden Verbindungen um einen Sesquiterpenkohlenwasserstoff (25; M^+ 204) und einen Sesquiterpenalkohol (24; M^+ 222) handelte. Aus dem Fragmentierungsmuster von 25 (s. Kap. 12.12.3.) konnten keine Hinweise auf die Struktur erhalten werden. Das Massenspektrum der zweiten Hauptkomponente stimmte - auch im direkten Vergleich - mit dem Sesquiterpenalkohol T-Muurolol (24) überein, der von Wiiluhn [70] als Hauptkomponente aus dem Rhizomöl von Arnica longifolia isoliert worden ist. Durch direkten gc und dc Vergleich in mehreren Systemen wurde weiter sichergestellt, daß dieser Sesquiterpenalkohol eine Hauptkomponente (ca. 48 %) des Blattöls von Arnica viscosa ist.



24: T-Muurolol

Der nicht identifizierte Sesquiterpenkohlenwasserstoff (25) und T-Muurolol (24, Anteil ca. 11 %) wurden durch DC-, GC- und GC/MS-Analyse auch im ätherischen Öl der Blütenkörbchen nachgewiesen. Die Analysen ergaben darüber hinaus hier keine Hinweise auf die Anwesenheit von Thymol und Thymolderivaten, die im Rhizomöl die Hauptkomponenten bilden.

7. KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER IN A. VISCOSA IDENTIFIZIERTEN VERBINDUNGEN

Im blühenden Kraut von A. viscosa wurden fünf Sesquiterpenlactone nachgewiesen. Es handelt sich bei ihnen um 7β,8β-Helenanolide. Drei dieser Verbindungen wurden isoliert und über die UV-, MS-, IR- und ^{1}H-NMR-Daten identifiziert. Es sind dies 11α,13-Dihydrohelenalin (2) und sein 6-O-Acetylderivat Arnicolid A (1), das nach der präparativen Ausbeute (0,1 % des Trockengewichtes) die Hauptkomponente ist. Beide Sl sind bereits häufiger in der Gattung Arnica gefunden worden (s. Tab. 2, S. 6).

Die Struktur des dritten isolierten Sl wurde als 2β-Hydroxy-6-O-acetyl-2,3,11α,13-tetrahydrohelenalin (3) ermittelt. Diese Verbindung ist bisher noch nicht beschrieben worden. Es könnte sich bei ihr um eine biosynthetische Vorstufe vom Arnicolid A handeln [79].

Die beiden anderen Sl wurden durch direkten DC-, GC- und GC/MS-Vergleich als Helenalin (4) und 6-O-Acetyl-helenalin (5) identifiziert, die in der Gattung Arnica bereits nachgewiesen worden sind (s. Tab. 2).

Mit Ausnahme von 3 wurden alle Sl auch in den Blütenkörbchen von A. viscosa identifiziert, deren Sl-Führung damit weitgehend identisch mit der des Krautes ist.

Aus der Stoffgruppe der Flavonoide wurden acht lipophile, z.T. hochmethylierte Verbindungen isoliert und durch UV-Analysen, ihre MS-, IR- und ^{1}H-NMR-Daten zweifelsfrei identifiziert. Es handelt sich bei ihnen um den 7-Monomethyl- und 7,4'-Dimethylether von Apigenin (7,6), um Cirsimaritin (13), um den 7,3'-Di- und den 7,3',4'-Trimethylether von Luteolin (12,11) sowie um die korrespondierenden Flavanone von 6 und 7 und das Flavanon Persicogenin (8 und 10 bzw. 9). Alle acht Verbindungen besitzen eine 5-OH- und 7-OMe-Substitution im Ring A.

In den Blütenkörbchen von A. viscosa dominieren ebenfalls die Verbindungen 6-13. In Spuren treten hier jedoch weitere Flavonoide auf, von denen die weit verbreiteten Flavonole Quer-

cetin (14) und Kämpferol (15) isoliert werden konnten.

In den Rhizomen wurde 3,55 % ätherisches Öl gefunden. Durch DC-, GC- und GC/MS-Analyse wurden als wesentliche Komponenten Thymol (17), dessen Mono- (18) und 6-OH-Dimethylether (20) sowie dessen Isobutter- (19), 2-Methylbutter- (21), 3-Methylbuttersäureester (= Isovaleriansäureester) (22) und Caryophyllenoxid (23) identifiziert. Diese Verbindungen stellen ca. 97 % des ätherischen Öls. Hauptkomponenten sind der 6-Hydroxythymoldimethylester und der Thymolisobuttersäureester mit ca. 50 bzw. 36 %. Das freie Thymol dürfte wahrscheinlich erst nach Lagerung aus den Estern hervorgegangen sein [76]. Gehalt und Zusammensetzung des Rhizomöls von A. viscosa ähneln insgesamt dem ätherischen Öl der unterirdischen Organe von A. montana [69].

Im ätherischen Öl der Blätter (0,14 %) und Blütenkörbchen (0,10 %) waren keine Thymolverbindungen nachweisbar. Hauptkomponente des Blattöls ist mit ca. 48 % der Sesquiterpenalkohol T-Muurolol (24), der auch im Blütenöl durch GC/MS-Analyse nachweisbar ist. T-Muurolol ist in ähnlicher Konzentration auch im ätherischen Öl der unterirdischen Organe von A. longifolia enthalten [69].

Des weiteren wurde Caryophyllenoxid (23) durch direkten DC-Vergleich auch im ätherischen Öl der Blätter und Blüten nachgewiesen.

8. ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER SESQUITERPENLACTONE UND FLAVONOIDE AUS DEN BLÄTTERN VON ARNICA NEVADENSIS A. GRAY

8.1. Gewinnung der mit Sesquiterpenlactonen und Flavonoiden angereicherten Extrakte

Die getrockneten und pulverisierten Blätter (300 g) wurden zuerst mit Petrolether/Diethylether (1:2), dann mit Methanol erschöpfend extrahiert und der erhaltene Methanolauszug mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Sowohl der Petrolether/Diethylether- als auch der Dichlormethanextrakt wurden an Sephadex LH 20 aufgetrennt, wobei jeweils eine Sl-Fraktion (N II bzw. NC II) und mehrere Flavonoid-Fraktionen (N IV - N VII bzw. NC IV - NC VIII) erhalten wurden (s. Tab. 35 und 36, S. 192)

8.2. DC-Analyse und säulenchromatographische Auftrennung der Sl-Extrakte

In den Sl-Fraktionen N II und NC II konnten dc (System 3) nach Besprühen mit Zimmermann-Reagenz keine blau- bzw. rotviolett gefärbten Substanzzonen nachgewiesen werden, so daß mit dem Vorliegen von Helenanoliden, wie sie u.a. in A. montana, A. chamissonis subsp. foliosa und A. viscosa gefunden wurden, nicht zu rechnen war. Bei Detektion mit Hydroxylamin/$FeCl_3$-Reagenz zeigten beide Extrakte positiv reagierende Komponenten im unteren R_f-Bereich (<0,5). In der aus dem Petrolether/Diethylether-Extrakt erhaltenen Fraktion N II war zusätzlich im oberen R_f-Bereich (0,93) eine Braunfärbung zu beobachten (s. Abb. 58).

Nach Besprühen mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz trat im Chromatogramm jeweils eine stark ausgeprägte rotviolette Zone auf. Oberhalb dieser Hauptkomponente (R_f = 0,34, System 3) erschien in beiden Extrakten eine dunkelblaue Substanzzone und direkt unterhalb der dominierenden Zone eine weitere rotviolette Zone (s. Abb. 58).

Zur Isolierung der im DC nachgewiesenen hydroxamatpositiven Substanzen wurden die an Sephadex LH 20 vorgereinigten Sl-

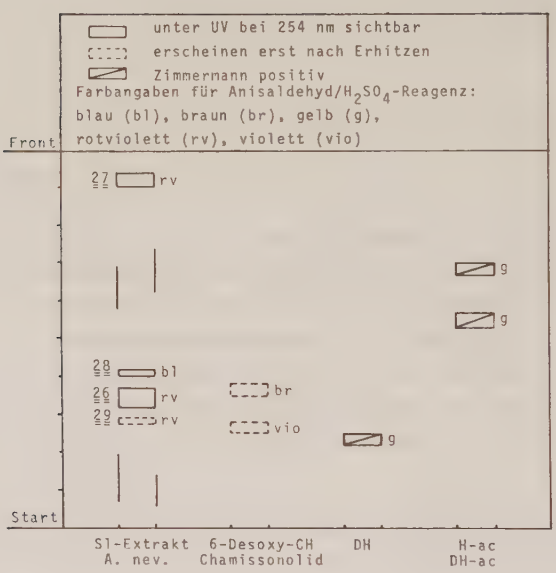
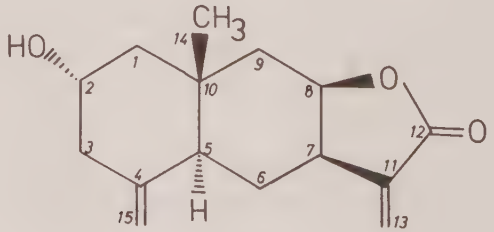


Abb. 53: DC des Extraktes N II aus den Blättern von A. nevadensis (System 3). Vergleichssubstanzen: DH = Dihydrohelenalin, DH-ac = 6-O-Acetyl-dihydrohelenalin, H-ac = 6-O-Acetyl-helenalin

Extrakte an Kieselgel mit Petrolether (40-60°C)/Diethylether-Gemischen sc aufgetrennt (s. Kap. 12.13.) und die aufgefangenen Fraktionen nach dc Oberprüfung zu jeweils sieben Teilfraktionen vereinigt (N II/1 - N II/7 bzw. NC II/1 - NC II/7, s. Tab. 37 und 38, S. 193).

8.2.1. Isolierung und Identifizierung von 26 (Ivalin)



Ivalin

Verbindung 26 fiel nach Zugabe von Diethylether zu den Fraktionen N II/5 und NC II/5 spontan aus. Nach mehrfachem Umkristallisieren aus Diethylether lag sie in Form von weißen Kristallnadeln vor (Schmp.: 128-130,5°C), die dc und gc in mehreren Systemen einheitlich waren. Nach der präparativen Ausbeute (insgesamt 132 mg = 0,045 % des Drogentrockengewichtes) handelt es sich um die Hauptkomponente der SI-Extrakte (System 3: R_f-Wert 0,34, Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz: rotviolett, S. Abb. 58).

Verbindung 26 zeigt im Massenspektrum (Abb. 59) einen Molekülpeak bei m/z 248. In Verbindung mit der CH-Analyse ergibt sich die Summenformel $C_{15}H_{20}O_3$. Das erste Fragment bei m/z 230 deutet auf die Abspaltung von Wasser hin und damit auf das Vorhandensein einer freien Hydroxygruppe. Das Folgefragment bei m/z 215 (M^+-18-15) resultiert aus der Abspaltung von Wasser und einer Methylgruppe. Der Basispeak liegt bei m/z 119. Das MS-Spektrum zeigt kaum Ähnlichkeit mit dem Fragmentierungsmuster von Pseudoguaianoliden (s. u.a. [30,40,42] und Kap. 4.2. dieser Arbeit).

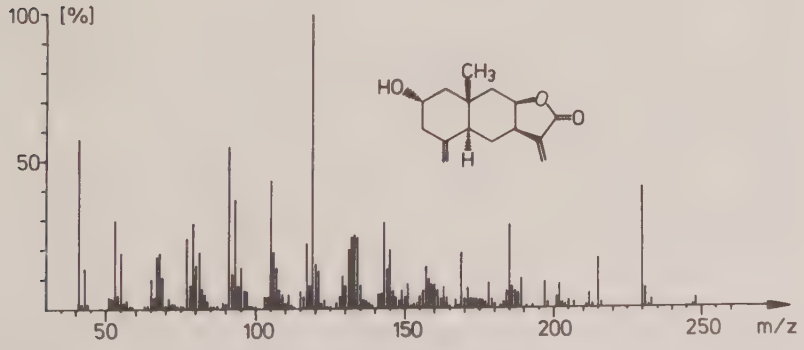


Abb. 59: MS-Spektrum von 26

Im IR-Spektrum (Abb. 60) findet sich bei 1765 cm^{-1} die typische Carbonylbande eines γ-Lactons in Konjugation zu einer Exomethylengruppe (s. u.a. [104,207,208]), die sich ihrerseits durch charakteristische Banden bei 3090, 1665 (C=C) und 820 cm^{-1} zu erkennen gibt. Das zweite im C=O-Bereich liegende Signal wird ebenfalls durch die Carbonylgruppe des Lactonringes

hervorgerufen, die unter bestimmten Umständen, abhängig vom Lösungsmittel und der Temperatur, bei ungesättigten Lactonen beobachtet werden kann [209]. Konovalova et al. [210] beschreiben diese Aufspaltung der Carbonylgruppe auch bei γ-Lactonen mit einer Exomethylengruppe. Die Absorptionsbande bei 1645 cm^{-1} weist auf eine zweite Doppelbindung im Molekül hin. Die Signale bei 3440 und 3390 cm^{-1} zeigen eine freie Hydroxygruppe an.

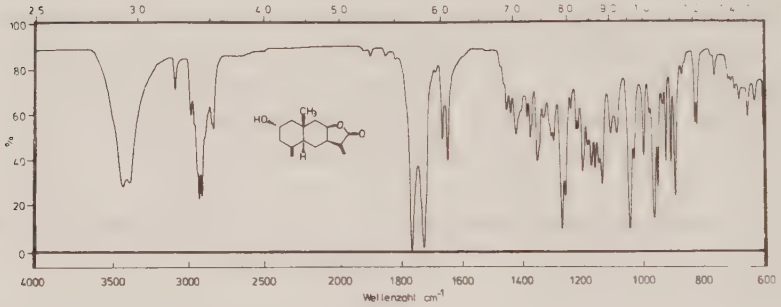


Abb. 60: IR-Spektrum von 26

Das dem IR-Spektrum zu entnehmende Vorliegen eines α-Methylenbutyrolactons wird durch das bei 209 nm liegende UV-Maximum bestätigt [208].

Wie das IR- und das UV-Spektrum erwarten ließen, erscheinen im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 61 und 62) zwei charakteristische Tieffeld-Dubletts für die Exomethylenprotonen H-13A und H-13B am γ-Lactonring (δ = 5.633 bzw. 6.138 ppm). Der Kopplungspartner ist in dem Signal bei δ = 3.015 ppm zu suchen, bei dem es sich somit um das Resonanzsignal von H-7 handelt, das mit H-13A und H-13B allylisch koppelt. Weiterhin koppelt H-7 mit den Protonen H-6α (δ = 1.815 ppm) und H-6β (δ = 1.367 ppm), sowie einem Proton, das bei δ = 4.535 ppm in Resonanz tritt. Aufgrund der Tieffeldverschiebung muß dieses Signal dem Proton H-8 zugeordnet werden, das am gleichen C-Atom lokalisiert ist, wie der Sauerstoff des Lactonringes. Damit kann das in fünf verbreiterte Linien aufspaltende Signal von H-7 als fünffaches Dublett erklärt werden.

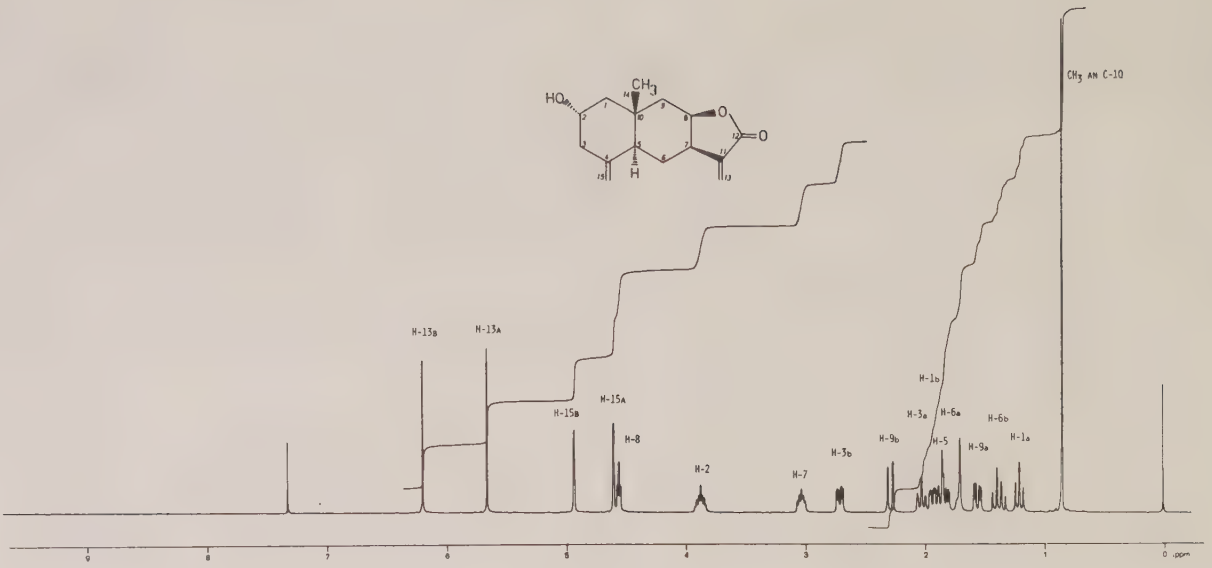


Abb. 61: ^{1}H-NMR-Spektrum von 26; Bezeichnung a = α und b = β

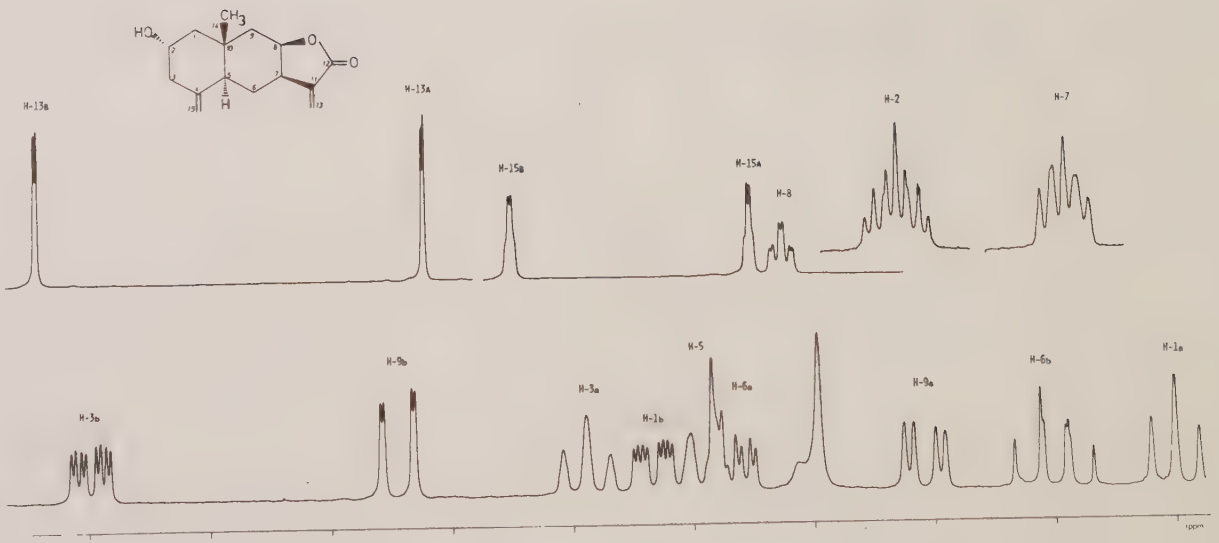


Abb. 62: Gespreizte ^{1}H-NMR-Signale von 26; Bezeichnung a = α und b = β

Weitere Kopplungspartner von H-8 sind die beiden Protonen H-9α (δ = 1.550 ppm) und H-9β (δ = 2.273 ppm), die ihrerseits nur noch eine geminale Kopplung aufweisen und damit keine weiteren Protonen in ihrer Nachbarschaft besitzen.

Durch Einstrahlung auf das in vier Linien aufspaltende Signal von H-6β läßt sich zeigen, daß dieses Proton, anders als bei den 7,8-verknüpften Pseudoguaianoliden (s. auch [41,42] und Kap. 4.2. dieser Arbeit) mit drei weiteren Protonen mit annähernd gleichen J-Werten koppelt: dem geminalen H-6α (J = 14 Hz), H-7 (J = 12.1 Hz) und einem weiteren Proton (H-5, J = 13.2 Hz), das als Kopplungspartner nur noch H-6α besitzt (J = 2.8 Hz).

Das Singulett bei δ = 0.842 ppm zeigt das Vorliegen einer tertiären Methylgruppe an.

Tab. 15: ^{1}H-NMR-Daten von 26 (Ivalin); gemessen bei 360 MHz in $CDCl_3$, in Klammern Literaturwerte von [39]

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
1α (ax)	1.198 (1.197)	dd	1α,1β	12.4 (12.2)
1β (äq)	1.923 (1.922)	ddd	1α,2	11.6 (~11.5)
2 (ax)	3.853 (3.853)	dddd	1β,2	4.5 (4.4)
3α (ax)	2.015 (2.012)	dd(br)	1β,3β	2.1 (2.2)
3β (äq)	2.697 (2.688)	ddd	2,3α	11.4 (11.0)
5 (ax)	1.857 (1.858)	dd(br)	2,3β	5.0 (5.0)
6α (äq)	1.815 (1.817)	ddd	3α,3β	12.2 (12.2)
6β (ax)	1.367 (1.372)	ddd	5,6α	2.8 (2.7)
7 (ax)	3.015 (3.010)	ddddd	5,6β	13.2 (13.9)
8 (äq)	4.535 (4.530)	ddd	6α,6β	14.0 (13.8)
9α (ax)	1.550 (1.543)	dd	6α,7	7.1 (7.0)
9β (äq)	2.273 (2.274)	dd	6β,7	12.1 (12.2)
13A	5.633 (5.622)	d	7,8	5.0 (4.8)
13B	6.168 (6.150)	d	7,13A	1.2 (<1.5)
15A	4.582 (4.570)	d(br)	7,13B	1.2 (<1.5)
15B	4.908 (4.900)	d(br)	8,9α	4.8 (4.8)
CH_3-an C-10 (ax)	0.842 (0.842)	s	8,9β	1.6 (1.7)
OH- an C-2 (äq)	1.693 (1.60-1.74)	s(br)	9α,9β	15.5 (15.6)
			15A,15B	1.5 (1.5)

In Übereinstimmung mit dem IR-Spektrum weisen zwei Dubletts bei δ = 4.908 und 4.582 ppm auf eine zweite Doppelbindung hin. Aufgrund der chemischen Verschiebung muß es sich hierbei um Protonen einer weiteren Exomethylengruppe handeln [110].

Das Auftreten des Signals bei δ = 3.853 ppm spricht dafür, daß hier das an dem Kohlenstoffatom lokalisierte Proton in Resonanz tritt, das auch Träger der OH-Gruppe ist. Diese erscheint als breites Singulett bei δ = 1.693 ppm. Die durch Doppelresonanz ermittelten Kopplungspartner des betreffenden Protons sind jeweils zwei benachbarte Ringmethylenprotonen (H-1α, H-1β sowie H-3α, H-3β), die keine weiteren Kopplungspartner haben.

Faßt man die bisherigen Ergebnisse zusammen (s. auch ^{1}H-NMR-Daten, Tab. 15), so muß es sich bei 26 um ein Eudesmanolid mit 7,8-cis-verknüpftem Lactonring handeln, das an C-2 eine α-ständige (äquatoriale) OH- und an C-4 eine Exomethylengruppe trägt (s. auch Abb. 63).

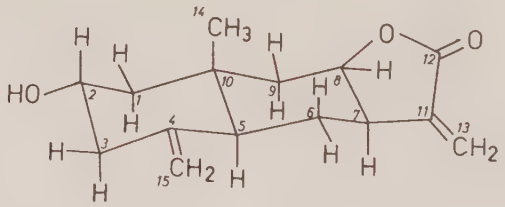


Abb. 63: Stereoformel von 26 (Ivalin)

Ein Eudesmanolid mit dieser Struktur wurde als erstes und bisher einziges Eudesmanolid der Gattung Arnica von Pretzsch [40] aus Arnica chamissonis ssp. chamissonis isoliert und von Kresken [42] NMR-spektroskopisch als Ivalin (26) identifiziert.

Das zusätzlich aufgenommene protonenentkoppelte ^{13}C-NMR-Spektrum (Abb. 64) zeigt ebenfalls volle Übereinstimmung mit den bereits publizierten ^{13}C-NMR-Daten [42,211] dieser Verbindung, wie der Tabelle 16 zu entnehmen ist. Auch im direkten DC-, GC-, GC/MS- und IR-Vergleich war 26 mit Ivalin identisch.

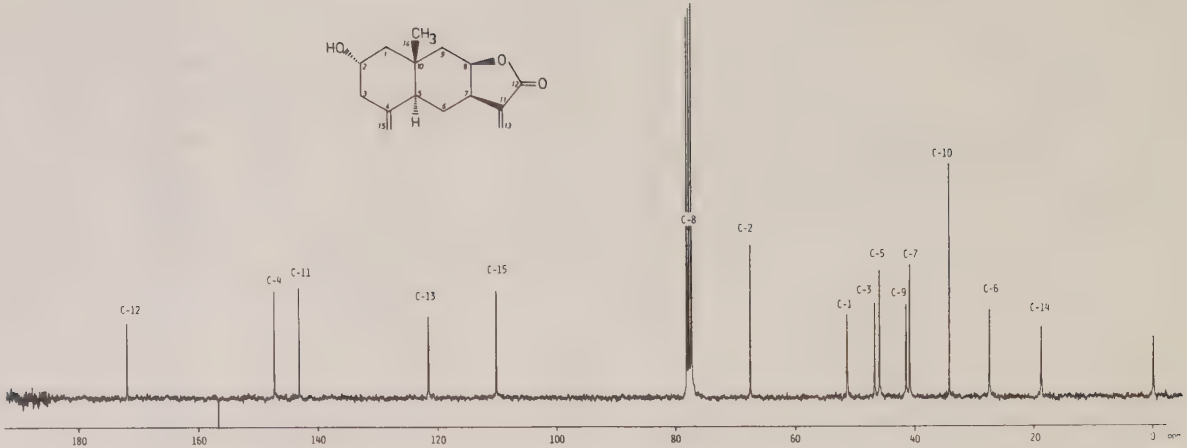


Abb. 64: Protonenentkoppeltes ^{13}C-NMR-Spektrum von 26

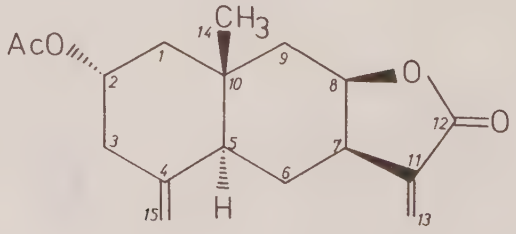
Tab. 16: ^{13}C-NMR-Verschiebungen von 26 (Ivalin); gemessen in $CDCl_3$, in Klammern Literaturwerte nach [211]

C-Atome	δ (ppm)	
1	50.901	(51.0)
2	66.900	(66.9)
3	46.280	(46.3)
4	146.044	(146.1)
5	45.509	(45.6)
6	27.248	(27.3)
7	40.455	(40.5)
8	76.657	(76.6)
9	41.064	(41.2)
10	33.923	(33.9)
11	141.952	(142.1)
12	170.516	(170.3)
13	120.417	(120.1)
14	18.711	(18.7)
15	109.120	(108.9)

Damit wurde erstmals in einer Arnica-Art als dominierendes Sl ein Eudesmanolid gefunden.

Ivalin wurde von Herz und Högenauer [212] aus Iva-Arten isoliert und konnte seitdem mehrfach in Asteraceen nachgewiesen werden [u.a. 81,111,213].

8.2.2. Isolierung und Identifizierung von 27 (2-O-Acetyl-ivalin)



2-O-Acetyl-ivalin

Verbindung 27 lag in Fraktion N II/2 stark angereichert vor. Sie konnte durch Zutropfen von Pentan zur etherischen Lösung der Fraktion in der Kälte (+5°C) auskristallisiert werden. Nach mehrfacher Umkristallisation aus Diethylether lag sie als dc und gc einheitliche, weiße, kristalline Verbindung vor (Schmp.: 147-148,5°C). Es handelte sich bei ihr um die unpolarste hydroxamatpositive Komponente des SI-Extraktes (R_f-Wert 0,93, System 3, s. Abb. 58). Nach Besprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz färbte sie sich wie 26 (Ivalin) rotviolett.

Das durch GC/MS-Kopplung erhaltene Massenspektrum (Abb. 65) zeigt ein Fragmentierungsmuster, das weitgehend mit dem von Ivalin (vgl. Abb. 59) identisch ist. Die Substanz lieferte keinen Molekülpeak, jedoch ein Fragment mit hoher Intensität bei m/z 43, das auf die Abspaltung eines Acetylrestes schließen läßt. Somit könnte das Bruchstück bei m/z 230 durch Abspaltung von Essigsäure aus dem Molekül (M^+-60) erklärt werden.

Die Ähnlichkeit in der MS-Fragmentierung, die hochgerechnete Molekülmasse von 290 und die sich daraus in Verbindung mit der CH-Analyse ergebende Summenformel $C_{17}H_{22}O_4$ lassen den Schluß zu, daß es sich bei 27 um den Essigsäureester von Ivalin handelt.

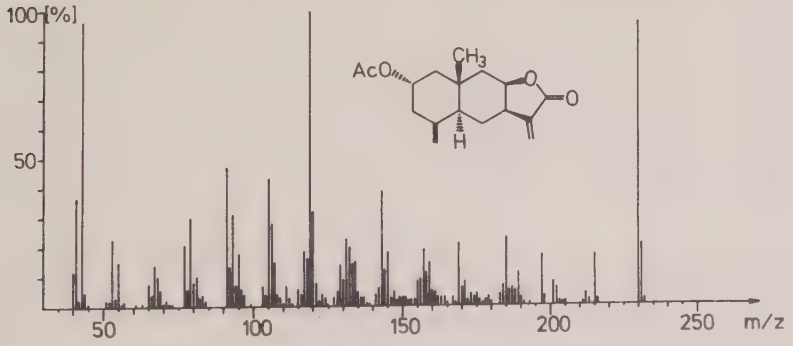


Abb. 65: MS-Spektrum von 27

Das IR-Spektrum (Abb. 66) bestätigt durch das Auftreten der Absorptionsbande bei 1735 cm^{-1} eine Estergruppe und durch das Signal bei 1232 cm^{-1} das Vorliegen einer Acetoxygruppe. Bei

1765 cm^{-1} erscheint die Bande eines γ-Lactons. Die Exomethylengruppe ist durch Signale bei 3080, 1665 und 815 cm^{-1} gekennzeichnet, während das Signal einer weiteren Doppelbindung bei 1648 cm^{-1} im Spektrum erscheint.

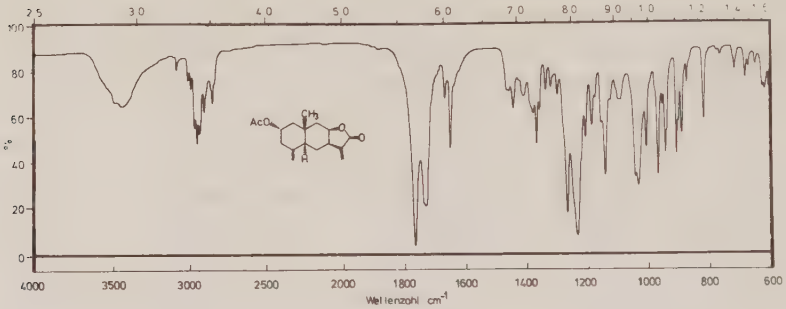


Abb. 66: IR-Spektrum von 27

Das UV-Maximum bei 210 nm deutet ebenfalls auf eine Exomethylengruppe in α-Stellung zur Ketogruppe des γ-Lactonrings hin [208].

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 67 und 68) sowie intensive Doppelresonanzexperimente belegen die Struktur und Konfiguration von 27 eindeutig als 2-O-Acetyl-ivalin. Aus der zu beobachtenden Tieffeldverschiebung des Protons an C-2 (δ = 4.917 ppm) gegenüber Ivalin (δ = 3.853 ppm) und dem Auftreten eines Singuletts mit der Intensität dreier Protonen bei δ = 2.043 ppm geht hervor, daß die Hydroxygruppe jetzt acetyliert vorliegen muß. Die vollständigen ^{1}H-NMR-Daten sind der Tabelle 17 zu entnehmen.

Die Identität von 27 mit 2-O-Acetyl-ivalin wurde zusätzlich durch direkten DC- und GC-Vergleich mit aus Ivalin synthetisiertem 2-O-Acetyl-ivalin bestätigt.

2-O-Acetyl-ivalin wurde mehrfach im Zusammenhang mit der Identifizierung von Ivalin dargestellt [210,212]. Sein natürliches Vorkommen wurde erstmals von Bohlmann et al. [111] beschrieben.

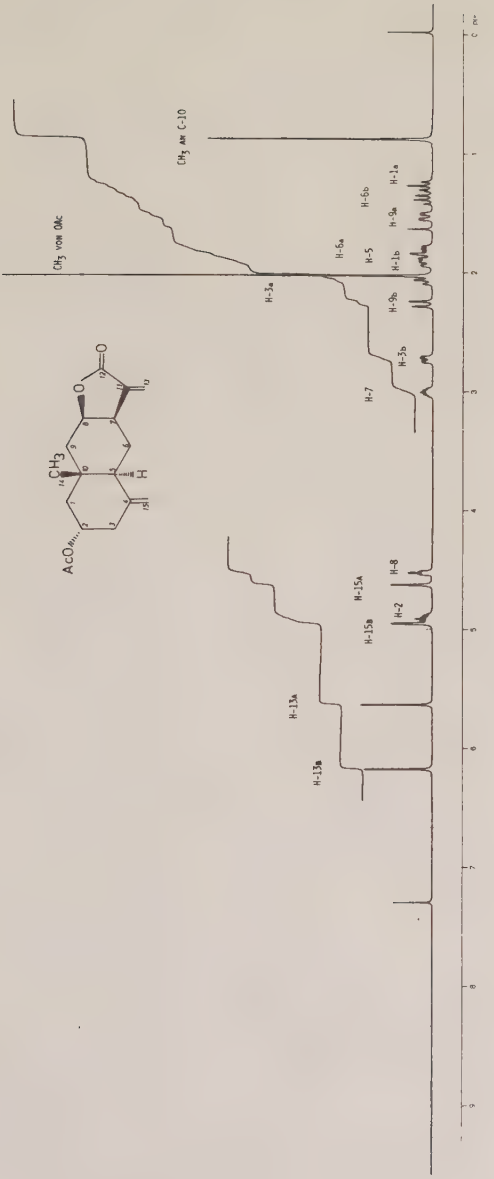


Abb. 67: ^{1}H-NMR-Spektrum von 2Z; Bezeichnung a = α und b = β

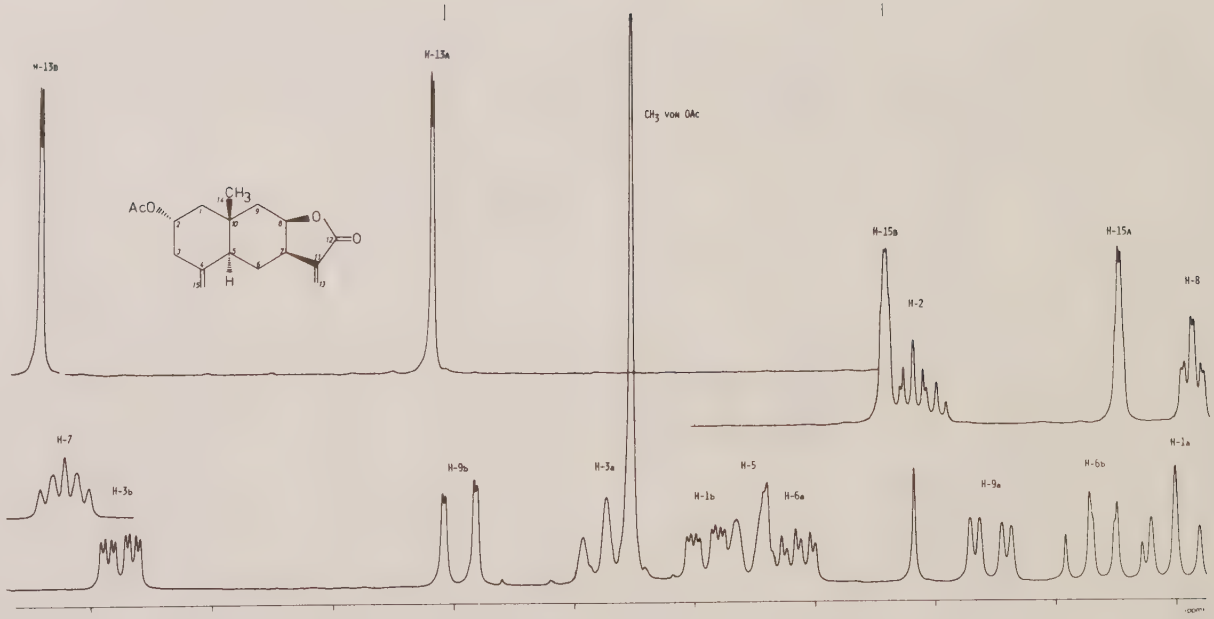
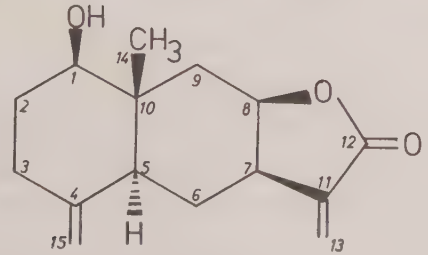


Abb. 68: Gespreizte ^{1}H-NMR-Signale von 27; Bezeichnung a = α und b = β

Tab. 17: ^{1}H-NMR-Daten von 27 (2-O-Acetyl-ivalin); gemessen bei 360 MHz in $CDCl_3$, in Klammern Literaturwerte nach [111]

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
1α (ax)	1.285 (1.26)	dd	1α,1β	12.3 (13)
1β (äq)	1.938 (1.86)	ddd	1α,2	11.8 (12)
2 (ax)	4.917 (4.91)	dddd	1β,2	4.5 (5)
3α (ax)	2.075 (2.25)	dd(br)	1β,3β	2 (--)
3β (äq)	2.740 (2.74)	ddd	2,3α	11.3 (12)
5 (ax)	1.873 (2.06)	dd(br)	2,3β	5.2 (5)
6α (äq)	1.805 (1.94)	ddd	3α,3β	12.3 (--)
6β (ax)	1.382 (1.40)	ddd	5,6α	2.6 (--)
7 (ax)	3.015 (3.00)	ddddd	5,6β	13.7 (12)
8 (äq)	4.530 (4.51)	ddd	6α,6β	14.1 (--)
9α (ax)	1.542 (1.54)	dd	6α,7	7.2 (6)
9β (äq)	2.275 (2.27)	dd	6β,7	11.6 (12)
13A	5.635 (5.61)	d	7,8	5.3 (5)
13B	6.177 (6.16)	d	7,13A	1.1 (1)
15A	4.632 (4.61)	d(br)	7,13B	1.1 (1)
15B	4.975 (4.94)	d(br)	8,9α	4.7 (5)
CH_3- an C-10 (ax)	0.898 (0.92)	s	8,9β	1.5 (2)
CH_3- von OAc	2.043 (2.03)	s	9α,9β	15.8 (16)
			15A,15B	1.1 (--)

8.2.3. Isolierung und Identifizierung von 28 (Asperilin)



Asperilin

In den Fraktionen N II/4 und NC II/4 lag das im DC oberhalb der Hauptkomponente Ivalin erscheinende hydroxamatpositive 28

vor (R_f-Wert 0,42, System 3, Abb. 58). Die vereinigten Fraktionen wurden über eine Lobar-Säule weiter gereinigt (s. Kap. 12.14.3.) und 28 danach durch präparative HPLC (System 2) mit dem Elutionsmittel n-Hexan/Isopropanol dc und gc einheitlich isoliert.

Das Massenspektrum (Abb. 69) zeigt den Molekülpeak bei m/z 248, woraus sich die gleiche Summenformel wie bei 26 ableiten läßt ($C_{15}H_{20}O_3$). Aus den Fragmenten m/z 230 (M^+-18) und 215 (M^+-18-15) kann auf eine Hydroxy- und eine Methylgruppe geschlossen werden. Anders als bei 26 (Abb. 59) und 27 (Abb. 65) zeigt 28 den Basispeak nicht bei m/z 119 sondern bei m/z 93, das als Fragment auch in den Spektren von 26 und 27 erscheint. Das Bruchstück mit der Masse 119 tritt im Spektrum von 28 jedoch mit der zweithöchsten Intensität auf (91 %), so daß es sich bei dieser Verbindung evtl. um ein Konstitutionsisomeres von Ivalin (26) handeln könnte.

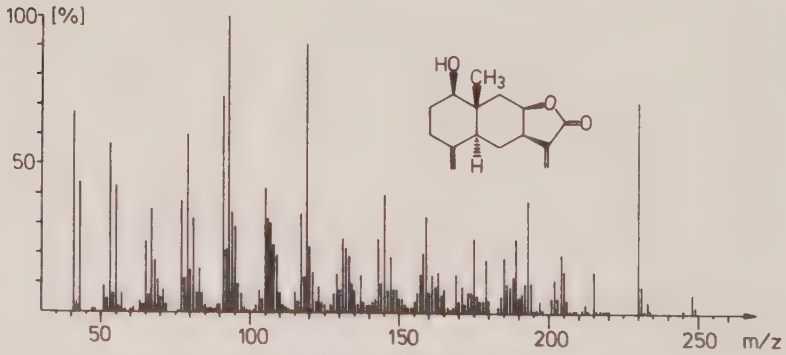


Abb. 69: MS-Spektrum von 28

Dem IR-Spektrum (Abb. 70) kann das Vorliegen einer freien OH-Gruppe (3460 cm^{-1}), eines γ-Lactonrings (1756 cm^{-1}), einer Exomethylengruppe (3080, 1665 und 820 cm^{-1}) und einer weiteren Doppelbindung im Molekül (1645 cm^{-1}) entnommen werden.

Das UV-Spektrum zeigt ein Maximum bei 210 nm und weist damit ebenfalls auf einen α,β-ungesättigten γ-Lactonring hin [208].

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 71 und 72) treten die Signale zweier Exomethylenprotonen auf (H-13A, δ = 5.633 ppm und H-13B,

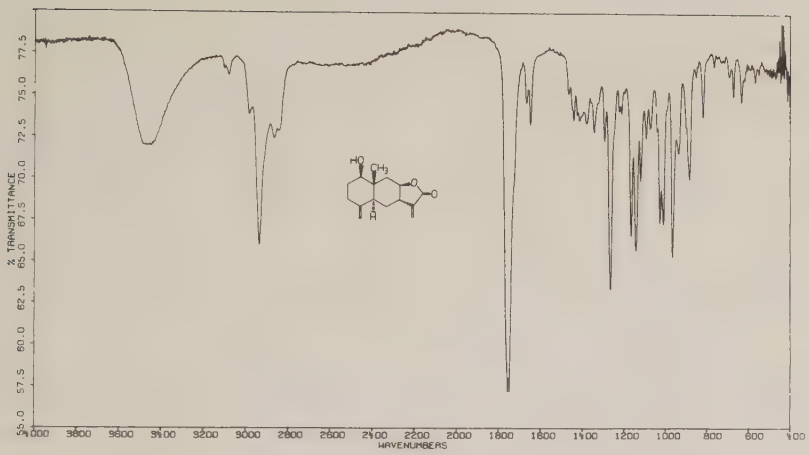


Abb. 70: IR-Spektrum von 28

δ = 6.183 ppm), die mit einem weiteren Proton (H-7, δ = 2.967 ppm) allylisch koppeln und somit das Vorliegen eines α-Methylen-γ-lactonringes belegen.

Bei Einstrahlung auf die Frequenz des H-7 ergibt sich eine Vereinfachung der Signale bei δ = 1.783 ppm (H-6α, ddd --> dd) und δ = 1.450 ppm (H-6β, ddd --> dd). Zusätzlich zur geminalen Kopplung (J = 14 Hz) zeigen diese Protonen nur noch eine vicinale Kopplung, wobei sich die Kopplungskonstanten (J = 2.3 Hz und J = 14 Hz) in dem bei δ = 1.817 ppm gelegenen breiten Dublett wiederfinden. Somit muß es sich hierbei um das Resonanzsignal des H-5 handeln, das außer den beiden Protonen an C-6 keine weiteren Kopplungspartner aufweist.

Ebenfalls vereinfacht wird das Signal von H-8, das bei δ = 4.583 ppm liegt und aufgrund seiner chemischen Verschiebung am gleichen C-Atom steht wie der Sauerstoff des Lactonringes.

Durch Einstrahlung auf das Signal von H-9β (δ = 2.642 ppm) wird klar, daß die Protonen an C-9 außer der geminalen Kopplung (J = 15.5 Hz), nur noch eine Kopplung mit H-8 zeigen.

Bezieht man die Signale bei δ = 4.855 und δ = 4.553 ppm (Protonen einer Exomethylengruppe), sowie das Singulett bei δ = 0.800 ppm (tertiäre CH_3-Gruppe an C-10) in die bisherigen Ergebnisse mit ein, so kann wie bei 26 auf ein 7,8-cis-Eudes-

manolid mit einer Exomethylengruppe an C-4 geschlossen werden.

Aufgrund seiner Lage muß es sich bei dem Signal bei δ = 3.430 ppm um das Resonanzsignal des Protons handeln, dessen C-Atom auch die Hydroxygruppe trägt. Das Aufspaltungsmuster (dd) läßt die Nachbarschaft von nur einer Methylengruppe zu. Damit kann es sich bei 28 nicht um das 2β-Hydroxystereoisomere von Ivalin (= Carpesin) handeln [210].

Literaturrecherchen ergaben, daß das H-3 Proton bei 7,8-cis-Eudesmanoliden mit einer Hydroxygruppe an C-3 im Bereich von 4.17 - 4.28 ppm in Resonanz tritt, wie z.B. bei 3-Epiisotelekin und Isotelekin [84] sowie Hybrifarin [214] und Granilin [215]. Ist die OH-Gruppe jedoch an C-1 lokalisiert, wie bei Asperilin und Ivasperilin [216], so erscheint das Signal von H-1 im Bereich von 3.4 - 3.5 ppm. Aufgrund der chemischen Verschiebung sollte deshalb die Hydroxygruppe bei 28 an C-1 stehen. Die Größen der Kopplungskonstanten zwischen H-1 und den Methylenprotonen an C-2 stehen im Einklang mit einer trans-diaxialen Kopplung zwischen H-2β und H-1 (J = 11.5 Hz) und einer cis-äquatorial-axialen Kopplung zwischen H-2α und H-1α (J = 4 Hz) [217-223]. Somit muß die OH-Gruppe β-konfiguriert sein, da bei α-ständiger (axialer) Hydroxygruppe die Kopplungskonstanten zwischen H-1 und H-2α bzw. H-2β wesentlich kleiner (im Bereich von ~ 2 Hz) und auch ähnlicher bzw. gleich sein müßten [219,224].

Das Fehlen der W-Kopplung zwischen den Protonen H-1 und H-3β kann als weiterer Hinweis für die β-Stellung der OH-Gruppe an C-1 angesehen werden.

Wegen Überlagerung der Signale von H-2 mit denen von H-6β und H-9α bzw. H-6α und H-5 ist ihre Multiplizität nicht zu erkennen. Ihre exakten Lagen lassen sich aus dem Einstrahlversuch auf die Frequenz von H-7 und der damit verbundenen Signalvereinfachung der Protonen an C-6 mit δ = 1.55 ppm (H-2β) und δ = 1.81 ppm (H-2α) bestimmen.

Die beiden noch nicht diskutierten ^{1}H-NMR-Signale liegen bei δ = 2.125 und 2.355 ppm. Sie müssen den H-3 Protonen zugeordnet werden, wobei das axial stehende Proton H-3α (δ = 2.125 ppm) neben der geminalen Kopplung (J = 13.5 Hz) erwartungsgemäß eine große Kopplung zu dem trans stehenden Pro-

Tab. 18: ^{1}H-NMR-Daten von 28 (Asperilin); gemessen bei 360 MHz in $CDCl_3$, in Klammern Literaturwerte nach [216]

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
1 (ax)	3.430 (3.4)	dd	1α,2α	4.0 (6)
2α (äq)	1.808 (-)	m	1α,2β	11.5 (9.5)
2β (ax)	1.55 (-)	m	2β,2β	13 (-)
3α (ax)	2.125 (-)	ddd	2α,3α	5.5 (-)
3β (äq)	2.355 (-)	ddd	2α,3β	2.2 (-)
5 (ax)	1.817 (-)	d(br)	2β,3α	13 (-)
6α (äq)	1.783 (-)	ddd	2β,3β	5 (-)
6β (ax)	1.450 (-)	ddd	3α,3β	13.5 (-)
7 (ax)	2.967 (-)	ddddd	5,6α	2.3 (-)
8 (äq)	4.583 (4.50)	ddd	5,6β	14 (-)
9α (ax)	1.500 (-)	dd	6α,6β	14.0 (-)
9β (äq)	2.642 (-)	dd	6α,7	7.0 (-)
13A	5.633 (5.48)	d	6β,7	12 (-)
13B	6.183 (6.01)	d	7,8	5.5 (-)
15A	4.553 (4.5)	d(br)	7,13A	~1 (1)
15B	4.855 (4.85)	d(br)	7,13B	~1 (~1)
CH_3- an C-10 (ax)	0.800 (0.8)	s	8,9α	5 (-)
			8,9β	1.5 (-)
			9α,9β	15.5 (-)
			15A,15B	1.5 (1.5)

ton H-2β (J = 13 Hz) und nur eine kleine vicinale Kopplung von 5.5 Hz zu dem cis-ständigen H-2α zeigt. Nach Entkopplung vereinfacht sich das Signal bei δ = 2.355 ppm zu einem Doppeldublett mit zwei kleineren Kopplungskonstanten ($J_{2\alpha,3\beta}$ = 2.2 Hz und $J_{2\beta,3\beta}$ = 5 Hz). Somit muß es sich hierbei um die Resonanzfrequenz des Protons H-3β handeln.

Damit ist 28 eindeutig als 7,8-cis-verknüpftes Eudesmanolid mit β-ständiger Hydroxygruppe an C-1 identifiziert. Sie wurde bereits 1963 von Herz und Viswanathan [216] aus Iva asperifolia Less. und Iva texensis Jackson isoliert und als Asperilin bezeichnet. Bohlmann et al. konnte sie auch in Telekia speciosa [225,226] und Inula helenium [111] nachweisen. Die in der Literatur angegebenen UV-, IR- und die wenigen ^{1}H-NMR-Daten stimmen mit denen der untersuchten Verbindung überein.

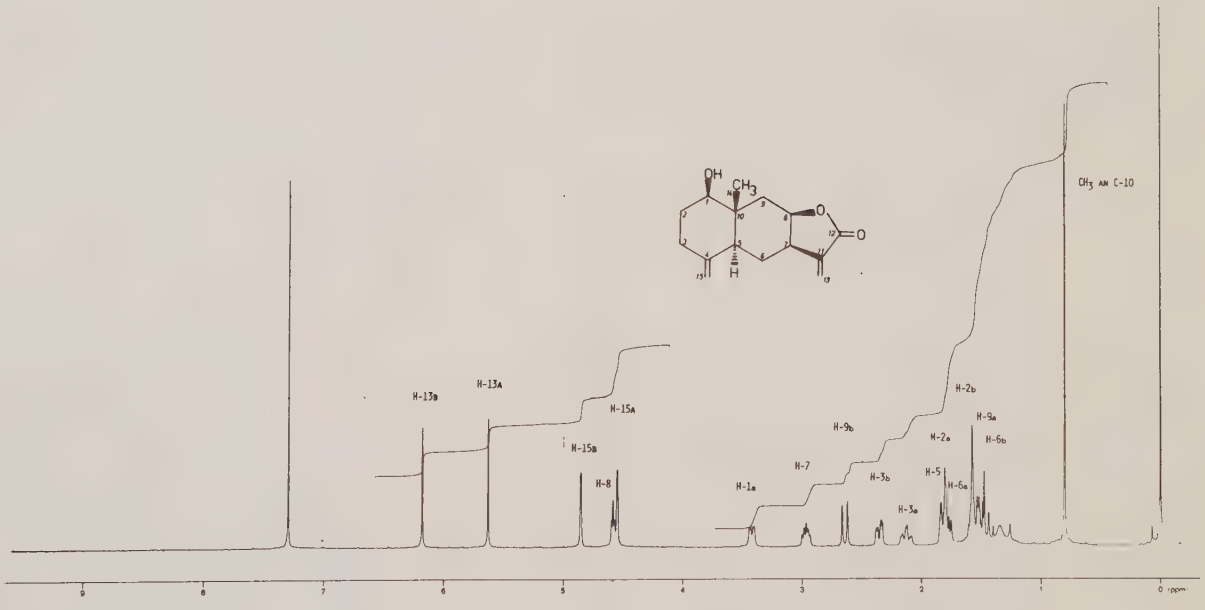


Abb. 71: ^{1}H-NMR-Spektrum von 28; Bezeichnung a = α und b = β

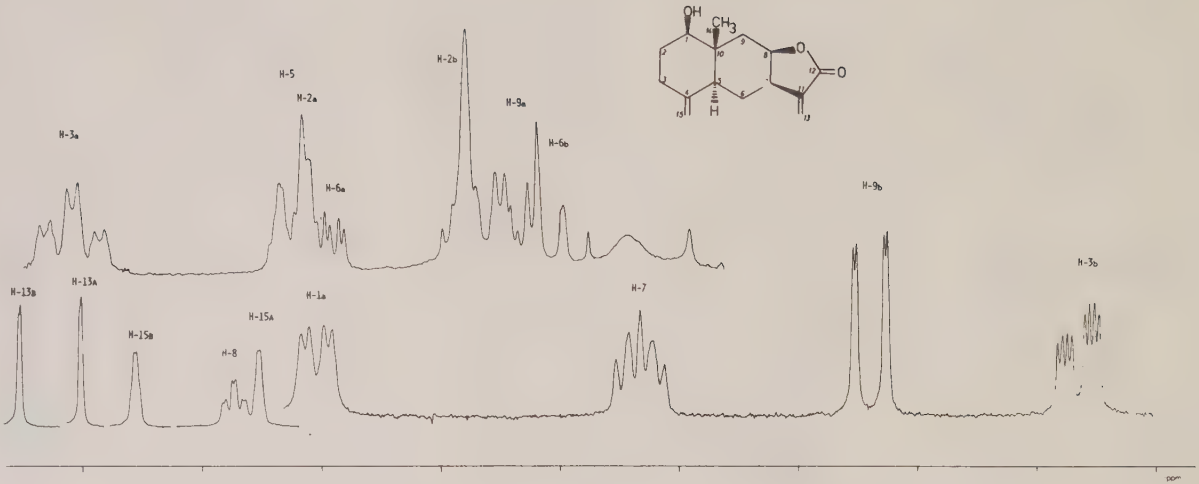
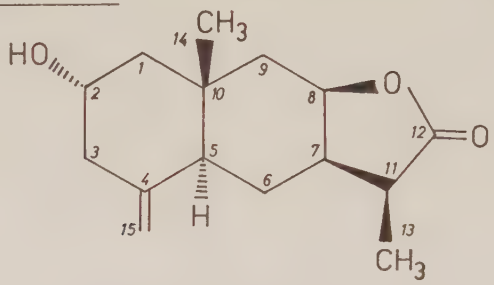


Abb. 72: Gespreizte ^{1}H-NMR-Signale von 28; Bezeichnung a = α und b = β

8.2.4. Isolierung und Strukturaufklärung von 29 (11α,13-Dihydroivalin)



11α,13-Dihydroivalin

Verbindung 29, die vierte hydroxamatpositive Zone im DC der S1-Fraktion (R_f 0,27, System 3; s. Abb. 58, S. 102), lag in der Teilfraktion NC II/6 stark angereichert vor. Sie wurde daraus durch SC an Kieselgel mit Diethylether/Pentan (9:1) als Elutionsmittel isoliert. Dabei fielen 1,5 mg weiße Kristalle dc und gc einheitlich an.

Im Massenspektrum (Abb. 73) bildet wie bei 26 und 27 das Bruchstück mit dem m/z-Wert von 119 den Basispeak. Der Molekülpeak erscheint bei m/z 250. Die Folgefragmente bei m/z 235, 232 und 217 sind aus der Abspaltung einer Methylgruppe (M^+-15), von Wasser (M^+-18) bzw. von beiden (M^+-15-18) erklärbar. Das MS deutet somit wieder auf ein Eudesmanolid hin. Der Massenunterschied zu Ivalin beträgt 2, als Summenformel ist $C_{15}H_{22}O_3$ anzunehmen.

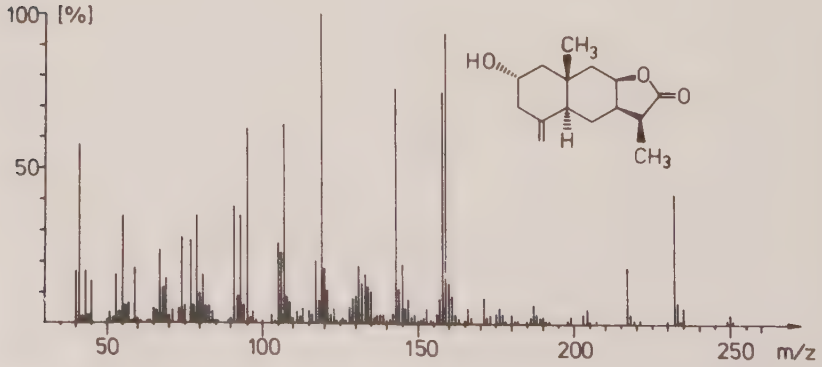


Abb. 73: MS-Spektrum von 29

Das IR-Spektrum (Abb. 74) zeigt Signale für eine freie OH-Gruppe (3420 cm^{-1}), eine Exomethylengruppe (3080, 1645 und 815 cm^{-1}) und eine Carbonylfunktion am γ-Lactonring (1768 cm^{-1}). Aus dem Fehlen der für α-Methylenbutyrolactone typischen C=C-Bande zwischen 1650 und 1675 cm^{-1} ergibt sich, daß 29 keine Exomethylengruppe am γ-Lactonring besitzen kann. Hiermit im Einklang steht die fehlende UV-Absorption, die bei den zu Vergleichszwecken synthetisierten 11,13-Dihydroprodukten von Ivalin [212] und Asperilin [216] ebenfalls nicht gegeben ist.

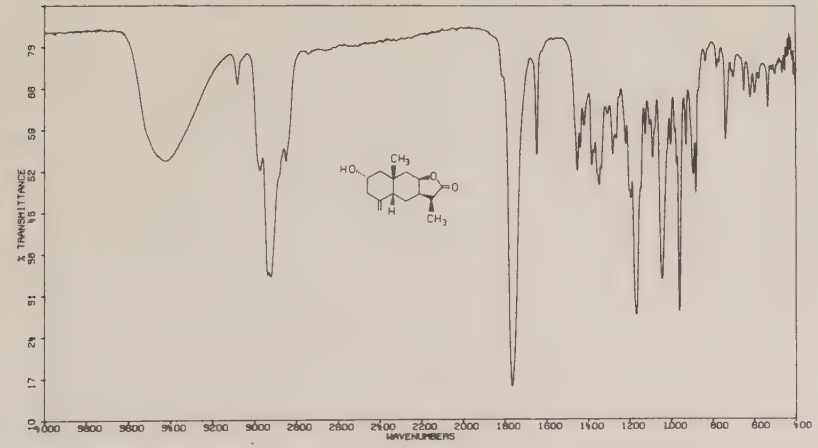


Abb. 74: IR-Spektrum von 29

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 75 und 76) fehlen im Vergleich zu Ivalin (26) erwartungsgemäß die beiden Resonanzsignale für die olefinischen Methylenprotonen am γ-Lactonring. Statt dessen findet sich ein Ein-Protonen-Signal bei δ = 2.833 ppm (Multiplizität dq) und ein zusätzliches Dublett bei δ = 1.236 ppm (CH_3 an C-11). Durch Einstrahlung auf die Frequenz des Protons H-11 kann der zweite Kopplungspartner H-7 bei δ = 2.419 ppm ermittelt werden. H-7 koppelt seinerseits nur noch mit den beiden H-6 Protonen (H-6α, H-6β, δ = 1.603 bzw. 1.117 ppm) und dem Proton an C-8 (δ = 4.505 ppm) und spaltet somit in ein vierfaches Dublett auf. Weitere Entkopplungsexperimente erlauben die einwandfreie Zuordnung sämtlicher Signale, deren chemische Verschiebungen und Aufspaltungsbilder weitgehend denen von Ivalin entsprechen (vgl. Tab. 19 und Tab. 15, S. 107).

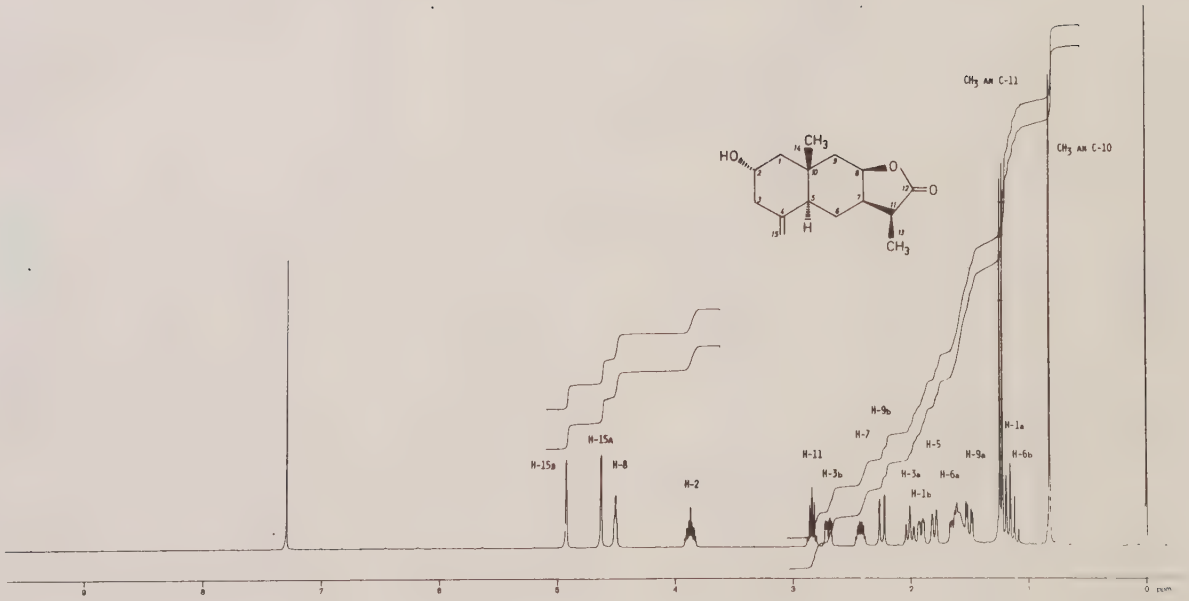


Abb. 75: ^{1}H-NMR-Spektrum von 29; Bezeichnung a = α und b = β

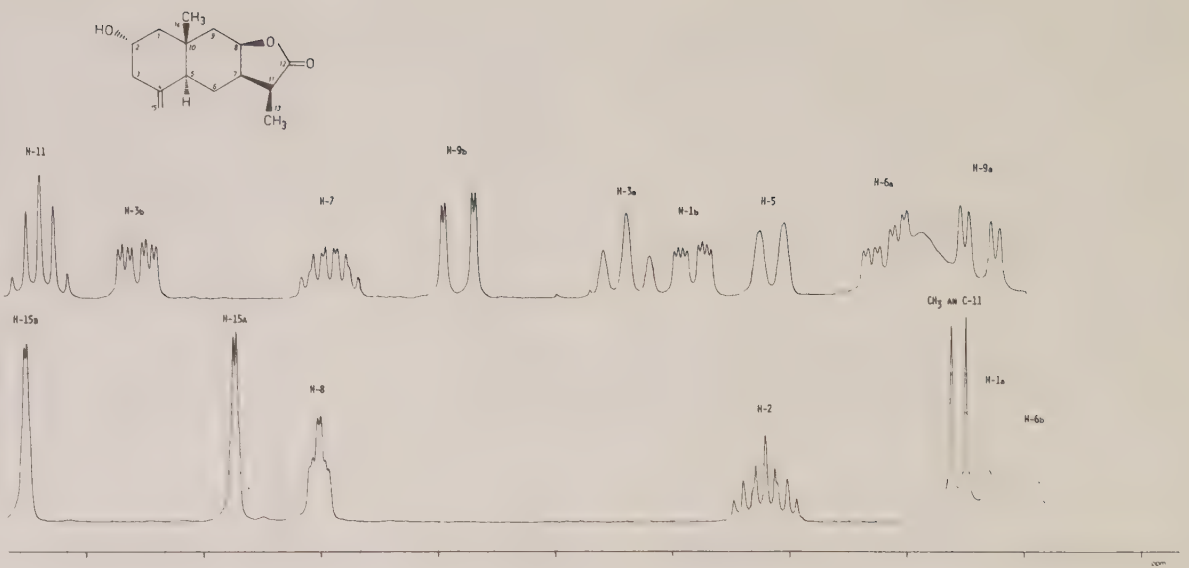


Abb. 76: Gespreizte ^{1}H-NMR-Signale von 29; Bezeichnung a = α und b = β

Tab. 19: ^{1}H-NMR-Daten von 29 (11α,13-Dihydroivalin); gemessen bei 360 MHz in $CDCl_3$

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
1α (ax)	1.186	dd	1α,1β	12.5
1β (äq)	1.908	ddd	1α,2	11.5
2 (ax)	3.858	dddd	1β,2	4.5
3α (ax)	2.005	dd(br)	1β,3β	2
3β (äq)	2.694	ddd	2,3α	11.5
5 (ax)	1.792	d(br)	2,3β	5
6α (äq)	1.603	ddd	3β,3β	12.2
6β (ax)	1.117	ddd	5,6α	2
7 (ax)	2.419	dddd	5,6β	12
8 (äq)	4.505	ddd	6α,6β	13.5
9α (ax)	1.508	dd	6α,7	6
9β (äq)	2.242	dd	6β,7	12
11	2.833	dq	7,8	4
15A	4.625	d	7,11	7
15B	4.925	d	8,9α	4
CH_3- an C-10 (ax)	0.819	s	8,9β	2
CH_3- an C-11	1.236	d	9α,9β	15.6
			11,13	7
			15A,15B	1.5

Somit handelt es sich bei 29 um 11α,13-Dihydroivalin, dessen natürliches Vorkommen noch nicht beschrieben worden ist. Es wurde jedoch zur Absicherung der Struktur von Ivalin [212] und für pharmakologische Zwecke [227,228] synthetisiert.

Für die sterische Stellung der Methylgruppe an C-11 lassen sich in der Literatur kaum vergleichbare Daten finden. Dreiding-Modellbetrachtungen ergaben, daß ein β-ständiges Proton an C-11 zu einem Diederwinkel von ungefähr 90° zwischen H-7 und H-11 führen muß, so daß entweder keine oder nur eine sehr kleine Kopplung beobachtet werden sollte [112]. Die Größe der Kopplungskonstante von $J_{7,11}$ = 7 Hz spricht somit für einen α-konfigurierten Wasserstoff an C-11 und ist in dieser Größenordnung auch von Nagasampagi et al. [229] bei Tetrahydroaspe-

rilin beobachtet worden. Bei 29 handelt es sich somit um das 11α,13-Dihydroivalin. Herz und Kumar [230] isolierten aus Baltimora recta neben dem Eudesmanolid 3-Epiisotelekin in Spuren die entsprechende 11α,13-Dihydroverbindung.

8.3. DC-Analyse der Flavonoid-Fraktion

Abbildung 77 zeigt das DC der nach Chromatographie an Sephadex LH 20 von A. nevadensis erhaltenen Flavonoid-Fraktionen NC IV bis NC VIII (s. Kap. 12.13.1.). Aufgrund des Fluoreszenzverhaltens nach dem Besprühen mit Naturstoffreagenz A sollte es sich bei den Flavonoiden der Fraktionen NC IV und NC V um 6-Methoxy-Flavone handeln, da sie hierbei unter UV-Licht lediglich als Fluoreszenzlöschung erscheinen [125]. Die Flavonoide der Fraktionen NC VI bis NC VIII hingegen fluoreszieren in dem gewählten Konzentrationsbereich [124] gelb bis gelbgrün bzw. orange [127]. In den aus dem Petrolether/Diethylether-Extrakt gewonnenen Fraktionen N IV bis N VIII wurden die gleichen Verbindungen gefunden (s. Kap. 12.13.1.).

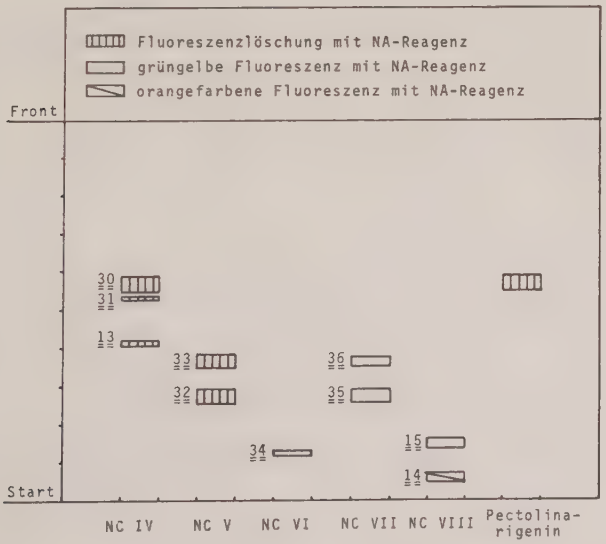
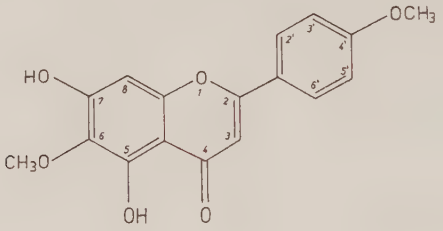


Abb. 77: DC der Flavonoide aus A. nevadensis nach Chromatographie an Sephadex LH 20 erhalten (System 6)

8.4. Isolierung von 13, 30 und 31

Die Fl-Komponente der vereinigten Fraktionen N IV und NC IV wurden durch präparative DC im System 6 getrennt. Nach üblicher Aufarbeitung (s. Kap. 12.4.2.) lagen danach 13 und 30 dc rein vor. Das nur in Spuren auftretende 31 konnte nur im Gemisch mit 30 isoliert werden.

8.4.1. Identifizierung von 30 (Pectolinarigenin)



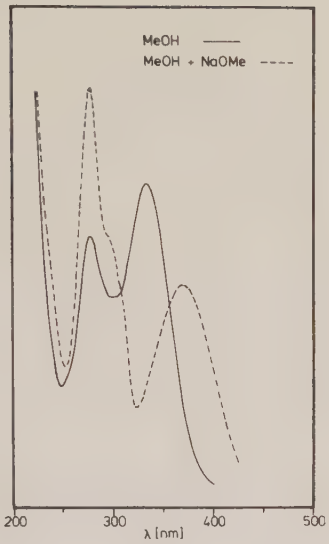
Pectolinarigenin

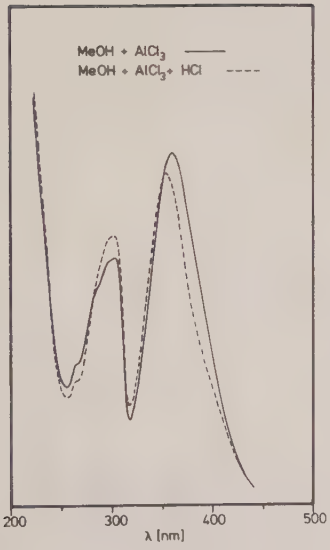
Verbindung 30 zeigte im DC (s. Abb. 77) dasselbe Fließ- und Detektionsverhalten wie das zum Vergleich mitchromatographierte Pectolinarigenin, das bereits häufiger aus Arnica-Arten isoliert worden ist (s. Tab. 3). Die unter Zusatz von Verschiebungsreagenzien durchgeführte UV-Analyse (Abb. 78) führte zu folgenden Strukturhinweisen ([92,93]; s. auch bei 6 und 13):

- MeOH: Flavon- oder 3-OMe-Flavonol; Maxima bei 276 nm (Bande I) und 332 nm (Bande II).
- NaOMe: Das Spektrum zeigt eine Intensitätsumkehr der beiden Maxima. Der starke Intensitätsanstieg der Bande II (ohne Verschiebung) kennzeichnet eine freie 7-Hydroxygruppe. Eine OH-Gruppe in 4'-Stellung wird nicht erwartet.
- NaOAc: Nahezu identische Absorptionskurve wie auf NaOMe-Zugabe.
- NaOAc/H_3BO_3: Keine vicinale Hydroxygruppierung im B-Ring.
- $AlCl_3$: Bande I erfährt eine Rotverschiebung von 26 nm, was auf eine freie 5-OH-Gruppe hindeutet. Da keine Aufspaltung

Verbindung 30

MeOH	: 276, 332
NaOMe	: 276, 368
$AlCl_3$	: 263 sh, 282 sh, 295 sh, 302, 358
$AlCl_3$/HCl	: 262, 301 sh, 352
NaOAc:	: 276, 298 sh, 367
NaOAc/H_3BO_3 (Proc. I)	: 280, 327 sh, 337





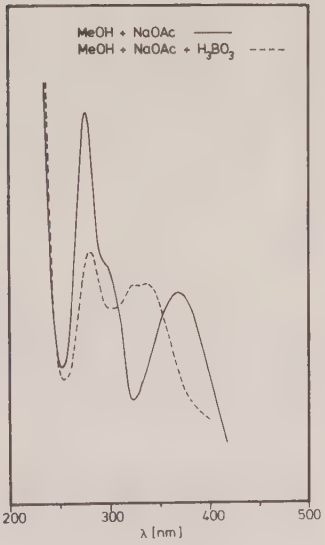


Abb. 78: UV-Spektren und λ_{max}-Werte [nm] von 30 (vgl. [128]; Abkürzungen nach [93])

der Banden (auch nicht als Schulter) zu beobachten ist, sollte die C-6-Position methoxyliert vorliegen.

- $AlCl_3/HCl$: Bande I wird bathochrom um 20 nm relativ zum MeOH-Spektrum verschoben. Die Größenordnung der Verschiebung, wie auch die Lage unterhalb von 381 nm, ist charakteristisch für Flavone mit einer 6-OMe-Gruppe an C-6 [130,191]. Das Auftreten der Bande II bei 301 nm und die Schulterandeutungen weisen auf einen 4'-monosubstituierten Ring hin [130].

Aufgrund der UV-Spektren sollte es sich bei 30 um ein Flavon mit Methoxygruppen an C-6 und C-4' und freien Hydroxygruppen an C-5 und C-7 handeln, d.h. um Pectolinarigenin.

Damit im Einklang steht auch das MS-Spektrum (Abb. 79), das ein für 6-OMe-Flavone typisches Fragmentierungsmuster zeigt (s. auch Abb. 21, S. 43 und Abb. 51, S. 87). Der Molekülpeak, der gleichzeitig den Basispeak darstellt, erscheint bei m/z 314. Das intensive Folgefragment bei m/z 299 (M^+-15) bestätigt die 6-OMe-Substitution und spricht gegen eine Methoxylierung der C-8-Position [139,140]. Ein A_1-Fragment fehlt im Spektrum, jedoch kann aus dem (A_1^+-Me)-Folgefragment bei m/z 167 auf einen A-Ring mit zwei Hydroxygruppen und einer Methoxygruppe geschlossen werden. B_1^+- und B_2^+-Fragmente sind bei m/z 132 und 135 zu finden und bestätigen die MeO-Substitution des B-Ringes.

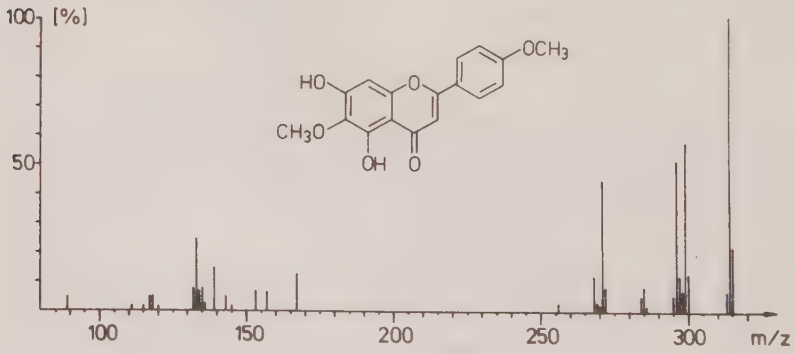


Abb. 79: MS-Spektrum von 30

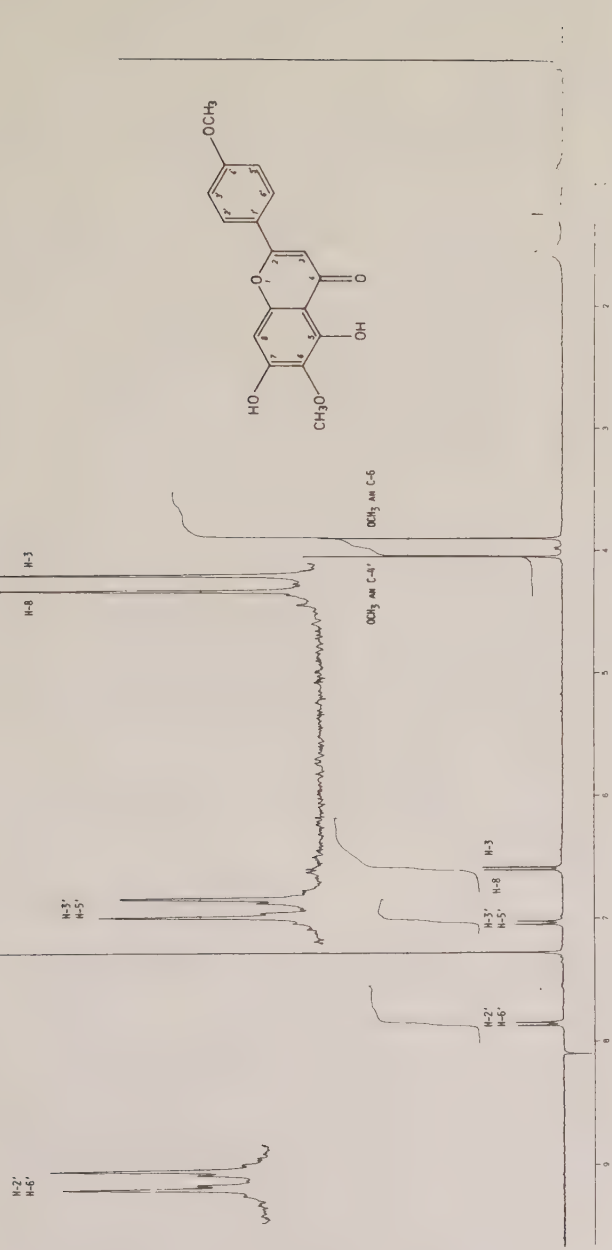


Abb. 8C: ^{1}H-NMR-Spektrum von 30

Das zur weiteren Absicherung der Struktur aufgenommene ^{1}H-NMR-Spektrum (s. Abb. 80 und Tab. 20) bestätigt die bisherigen Analysenergebnisse.

Tab. 20: ^{1}H-NMR-Daten von 30 (Pectolinarigenin); gemessen bei 360 MHz in $CDCl_3$

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
3	6.585	s		
8	6.610	s		
2'/6'	7.863	d	2'/3'	9
3'/5'	7.040	d	5'/6'	9
CH_3O- an C-6	3.910	s		
CH_3O- an C-4'	4.058	s		

Die UV-, MS- und ^{1}H-NMR-Daten von 30 sind vollständig identisch mit den spektralen Daten von authentischem Pectolinarigenin, das schon häufiger in der Gattung Arnica nachgewiesen werden konnte (s. Tab. 3). Nach Wollenweber [63] ist es ein weit verbreiteter Inhaltsstoff in Asteraceen, wurde aber auch schon in Betulaceae [150], in Verbenaceae [231,232] und Scrophulariaceae [253] gefunden.

8.4.2. Charakterisierung von 31 als 5,6,7,3',4'-substituiertes Flavon

Da 31 (R_f 0,54, System 6) nur im Gemisch mit Pectolinarigenin (R_f 0,56, System 6) isoliert werden konnte, können zur Charakterisierung nur einige MS- und ^{1}H-NMR-Daten (s. auch Kap. 12.15.2.) herangezogen werden.

Dem Massenspektrum des Substanzgemisches kann für 31 ein Molekülpeak bei m/z 344 mit Folgefragmenten bei m/z 329 (M^+-Me) und 301 (M^+-Me-CO) entnommen werden. Der Molekülpeak läßt auf ein Flavon mit drei Methoxy- und zwei Hydroxygruppen schließen.

Die im ^{1}H-NMR-Spektrum, zusätzlich zu den Signalen von Pectolinarigenin (30) auftretenden, drei Singuletts im Bereich für am Aromaten lokalisierte Methoxygruppen, bestätigen diese An-

nahme. Zwei Ein-Protonen-Singuletts bei δ = 6.603 ppm (H-3) und 6.628 ppm (H-8) zeigen das unsubstituierte Vorliegen der C-3- und C-8-Position an. Für den Ring B erscheinen im tieferen Feld des Spektrums drei Signale, deren Aufspaltungsmuster für eine 3',4'-Disubstitution spricht. Die vollständigen ^{1}H-NMR-Daten sind dem Kap. 12.15.2. zu entnehmen.

Aus diesen wenigen Analysendaten geht eindeutig hervor, daß es sich bei 31 um ein 5,6,7,3',4'-substituiertes Flavon mit zwei Hydroxy- und drei Methoxygruppen handelt. Geht man davon aus, daß wegen der auftretenden Fluoreszenzlöschung nach Besprühen mit NA-Reagenz eine 6-OMe-,5-OH-Gruppierung im Molekül enthalten ist, dann sollte es sich bei 31 um eine der drei folgenden Verbindungen handeln (Abkürzungen nach [63]): Eupatilin (5,7-OH,6,3',4'-OMe-Flavon), Eupatorin (5,3'-OH,6,7,4'-OMe-Flavon) oder Cirsilineol (5,4'-OH,6,7,3'-OMe-Flavon).

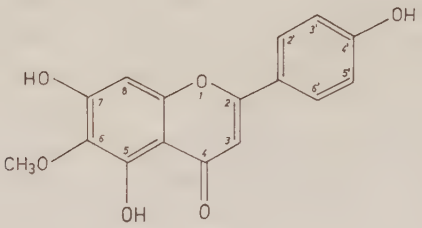
8.4.3. Identifizierung von 13 (Cirsimaritin)

Die polarste Fl-Komponente der vereinigten Fraktionen N IV und NC IV (s. Abb. 77, S. 127) wurde anhand ihrer UV-, MS- und ^{1}H-NMR-Daten sowie durch direkten DC-Vergleich als 6-Methoxygenkwanin identifiziert. Dieses als Cirsimaritin bezeichnete Flavon wurde bereits als Inhaltsstoff von A. viscosa (s. Kap. 4.6.) identifiziert. Die analytischen Daten von 13 können dem Experimentellen Teil Kap. 12.9.7. entnommen werden.

8.5. Isolierung von 32 und 33

Die beiden in den Fraktionen N V und NC V auftretenden Fl-Komponenten (s. Abb. 77, S. 127) konnten nach Vereinigung der beiden Fraktionen aus Methanol bei +5°C auskristallisiert werden. Ihre Trennung erfolgte durch präparative DC an Kieselgel 60-Fertigplatten im System 6. Danach lagen 32 und 33 dc einheitlich vor. Der Ausbeute entsprechend handelt es sich bei 32 um eine der Hauptkomponenten der Fl-Gesamtfraktion.

8.5.1. Identifizierung von 32 (Hispidulin)



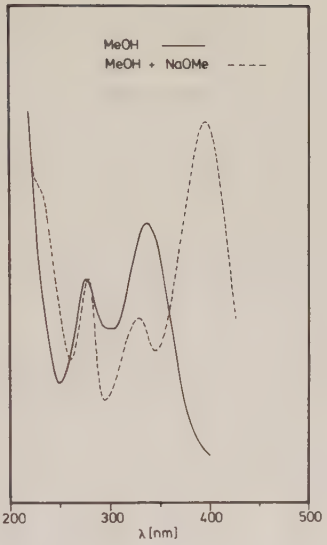
Hispidulin

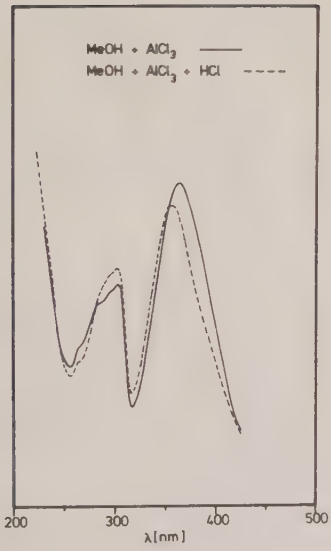
Die UV-Analyse unter Zusatz von Shift-Reagenzien ([92,93], s. auch 6 und 13) deutete auf folgendes Substitutionsmuster hin (s. auch Abb. 81):

- MeOH: Bande I zeigt ein Maximum bei 335 nm und Bande II bei 275 nm. Die Absorptionskurve deutet auf ein Flavon oder ein 3-OMe-Flavonol hin.
- NaOMe: Bande I wird unter starkem Intensitätsanstieg bathochrom nach λ_{max} 394 nm verschoben, so daß eine freie 4'-OH-Gruppe im Molekül vorliegen sollte. Das gleichzeitige Auftreten einer Bande III bei 328 nm zeigt die unsubstituierte Hydroxygruppe an C-7 an [127].
- NaOAc: Ähnliches Spektrum wie nach NaOMe-Zugabe.
- NaOAc/H_3BO_3: Vicinale Hydroxygruppen sind bei 32 nicht zu erwarten.
- $AlCl_3$: Die bathochrome Verschiebung von Bande I ohne Peakaufspaltung gibt die freie 5-OH-Gruppe mit einer weiteren O-Substitution an C-6 zu erkennen, wobei die Form der Kurve auf einen 6-OMe-Substituenten schließen läßt [130].
- $AlCl_3$/HCl: Der Shift-Wert von 20 nm der Bande I spricht für die 6-OMe-Substitution [130,191] und bestätigt die Abwesenheit von o-Dihydroxygruppen. C-8 muß unsubstituiert vorliegen. Die Schulterandeutungen der Bande II liegen sowohl in saurer als auch in neutraler $AlCl_3$-Lösung in dem von Voirin [130] für 4'-monosubstituierte Flavone angegebenen Bereich.

Verbindung 32

MeOH	: 275, 335
NaOMe	: 276, 328, 394
$AlCl_3$	: 265 sh, 280 sh, 294 sh, 303, 363
$AlCl_3$/HCl	: 263, 287 sh, 303, 356
NaOAc	: 275, 308, 383
NaOAc/H_3BO_3 (Proc. I)	: 278, 342





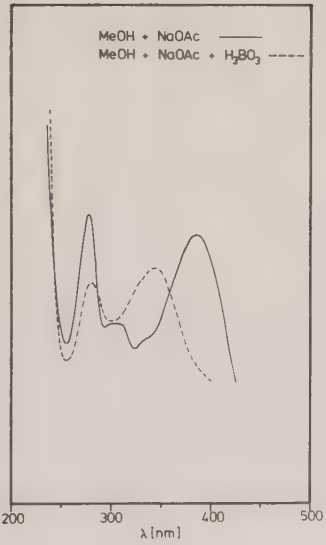


Abb. 81: UV-Spektren und λ_{max}-Werte [nm] von 32 (vgl. [192]; Abkürzungen nach [93])

Nach der UV-Analyse liegt ein Flavon mit Hydroxygruppen an C-5, C-7 und C-4' sowie einer Methoxygruppe an C-6 vor.

Damit im Einklang steht das Fragmentierungsmuster des MS-Spektrums (Abb. 82). Es zeigt den Molekülpeak (Basispeak) bei m/z 300 und zwei typische Fragmente für 6-OMe-Flavonoide bei m/z 285 (M^+-15) und 282 (M^+-18) (s. auch Abb. 21, S. 43 und Abb. 51, S.87). Die Bruchstücke bei m/z 271 bzw. 257 gehen durch Abspaltung von -HCO bzw. Me-CO- aus dem Molekül hervor. Die A-Ring-Fragmente treten bei m/z 167 (A_1^+-Me) und 139 (A_1^+-Me-CO) auf und bestätigen die Substitution des A-Ringes mit zwei freien und einer methylierten Hydroxygruppe. Der B-Ring kennzeichnet sich durch die Fragmente (B_1^+) und (B_2^+) bei m/z 118 und 121 als Träger einer Hydroxygruppe.

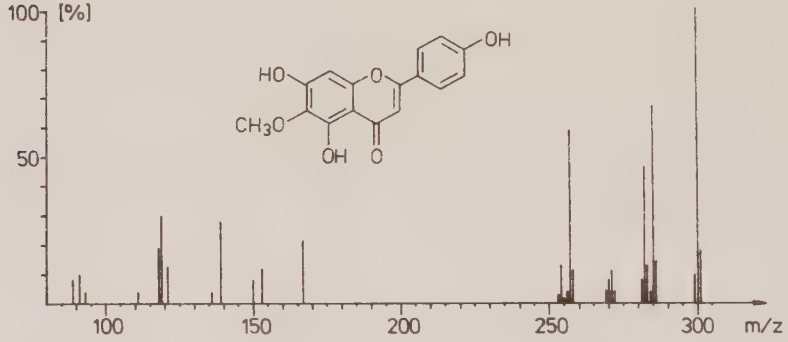


Abb. 82: MS-Spektrum von 32

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 83) zeigen die B-Ring-Protonen im tiefen Feld des Spektrums eine AA'XX'-Aufspaltung, die typisch für p-substituierte Aromaten ist. Neben den Resonanzsignalen von H-8 (δ = 6.598 ppm) und H-3 (δ = 6.563 ppm) findet man ein weiteres Singulett mit der Intensität für drei Protonen, das die Methoxygruppe im Molekül bestätigt. Sämtliche ^{1}H-NMR-Daten sind der Tabelle 21 zu entnehmen.

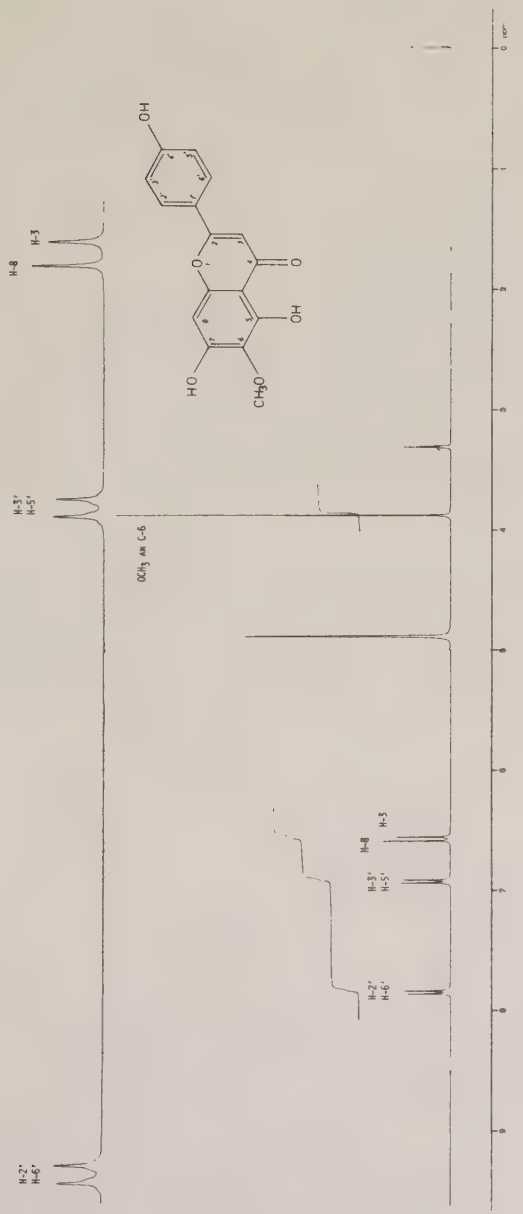


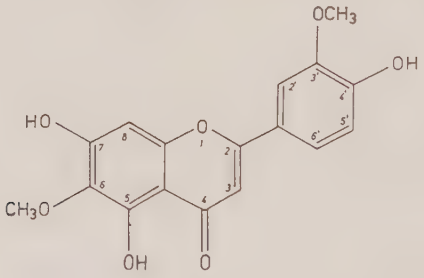
Abb. 83: ^{1}H-NMR-Spektrum von 32

Tab. 21: ^{1}H-NMR-Daten von 32 (Hispidulin); gemessen bei 360 MHz in Methanol-d_4

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
3	6.563	s		
8	6.598	s		
2'/6'	7.846	d	2'/3'	9
3'/5'	6.933	d	5'/6'	9
CH_3O- an C-6	3.888	s		

Verbindung 32 ist in allen spektralen Daten und im direkten DC-Vergleich identisch mit Hispidulin (6-Methoxy-Apigenin, Dinatin), einem Flavon, das schon häufiger in der Gattung Arnica nachgewiesen wurde (Tab. 3) und auch zu den für Asteraceen typischen Flavonoiden zählt [63,85].

8.5.2. Identifizierung von 33 (Jaceosidin)



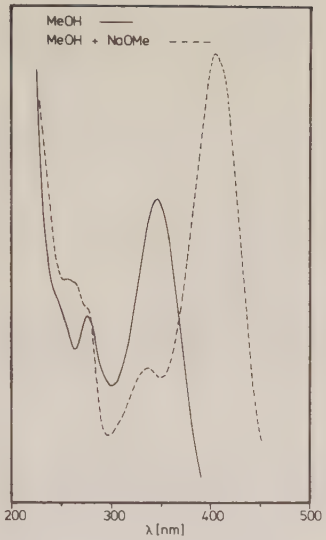
Jaceosidin

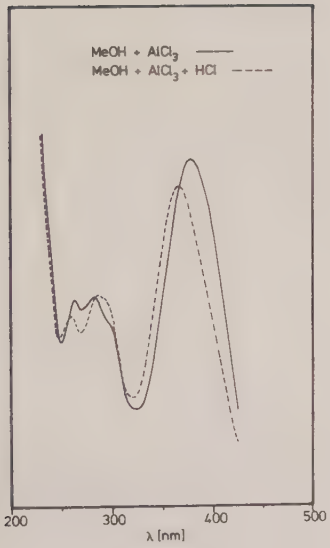
Die UV-Analyse von 33 (Abb. 84) unter Zugabe von Verschiebungsreagenzien ([92,93]; s. auch Verbindung 6 und 13) führte zu folgenden Informationen:

- MeOH: Flavon- oder 3-OMe-Flavonol-Absorptionskurve mit Maxima bei 345 nm (Bande I) und 275 nm (Bande II). Die langwelligere Absorption der Bande I deutet auf einen höher substituierten B-Ring hin (vgl. 11 und 12) als es bei 32 der Fall ist.

Verbindung 33

MeOH	: 275, 345
NaOMe	: 255 sh, 265 sh, 277 sh, 335, 402
$AlCl_3$	: 263, 283, 298 sh, 377
$AlCl_3$/HCl	: 260, 285, 295 sh, 365
NaOAc	: 276, 322, 396
NaOAc/H_3BO_3 (Proc. I)	: 277, 345





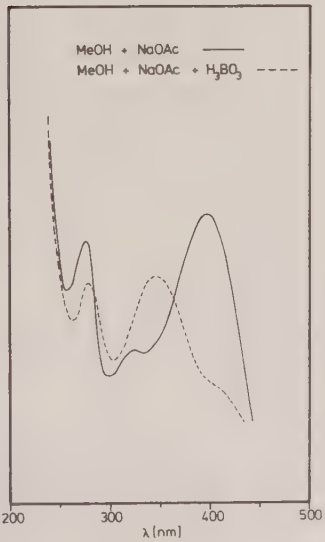


Abb. 84: UV-Spektren und λ_{max}-Werte [nm] von 33 (vgl. [234]; Abkürzungen nach [93])

- NaOMe: Bande I wird bei gleichzeitiger starker Intensitätszunahme bathochrom um 57 nm verschoben. Da ebenfalls eine Bande III zu beobachten ist, werden freie OH-Gruppen an C-7 und C-4' erwartet [131].
- NaOAc: Vergleichbares Absorptionsspektrum wie nach NaOMe-Zugabe.
- $NaOAc/H_3BO_3$: Es sind keine o-Dihydroxygruppen im Molekül vorhanden.
- $AlCl_3$: Bande I erfährt eine Rotverschiebung von 32 nm, spaltet jedoch nicht in zwei Peaks auf. Verbindung 33 sollte deshalb eine freie 5-OH-Gruppe sowie eine 6-OMe-Substitution besitzen.
- $AlCl_3/HCl$: Die bathochrome Verschiebung der Bande I von 20 nm bestätigt die 6-OMe-Substitution und die Abwesenheit vicinaler Hydroxygruppen. Form und Lage der Bande I weisen 33 als Flavon aus, weshalb eine 6-OH-Substitution auch durch die Absorptionslage der Bande II in methanolischer Lösung (<279 nm) ausgeschlossen werden kann [130].

  Eine Disubstitution des B-Ringes läßt sich für Flavone auch aus dem Auftreten eines Doppelpeaks der Bande II in neutraler $AlCl_3$-Lösung ableiten. Das Auftreten der Bande IIb im Bereich von 260 nm, der Bande IIa zwischen 280-290 nm und eine Schulterandeutung bei 292-298 nm sind nach Voirin [130] charakteristisch für 6-OMe-Flavone mit 3',4'-Disubstitution.

Nach UV-Analyse wird ein Flavon mit freien OH-Gruppen in 5,7- und 4'-Position sowie Methoxygruppen in 6- und 3'-Stellung erwartet.

Das MS-Spektrum (Abb. 85; Erklärung der Fragmentionen s. Abb. 21, S. 43 und Abb. 51, S. 87) bestätigt durch den Molekülpeak (Basispeak) bei m/z 330 das Vorliegen eines Flavons mit drei Hydroxy- und zwei Methoxygruppen. Das Fragmentierungsmuster zeigt, daß der A-Ring mit zwei OH-Gruppen und einer OCH_3-Gruppe substituiert ist (A_1^+-Me-Fragment bei m/z 167) und der B-Ring nur eine OCH_3- und eine OH-Gruppe trägt (B_1^+- und B_2^+-Fragmente bei m/z 148 und 151).

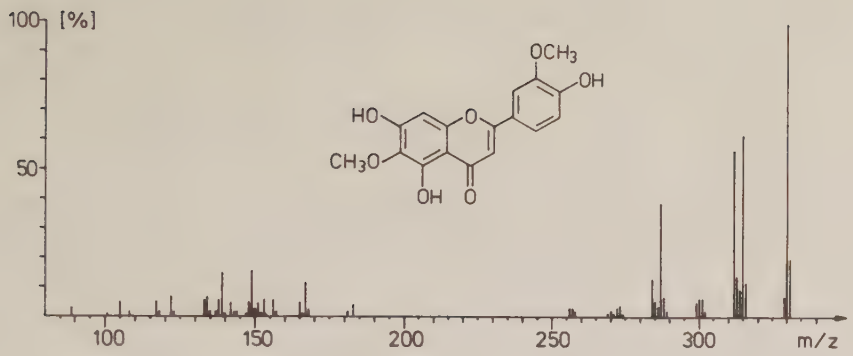


Abb. 85: MS-Spektrum von 33

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 86 und Tab. 22) zeigt das AMX-Aufspaltungsmuster für die drei Protonen des B-Ringes mit chemischen Verschiebungen und Aufspaltungsmustern wie sie für die Resonanzsignale der 2'-, 5'- und 6'-Protonen von 12 (s. Tab. 13, S. 83) gefunden und diskutiert wurden, so daß bei 33 das gleiche Substitutionsmuster vorliegt. Die vollständigen ^{1}H-NMR-Daten sind der Tab. 22 zu entnehmen.

Tab. 22: ^{1}H-NMR-Daten von 33 (Jaceosidin); gemessen bei 400 MHz in $CDCl_3$

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
3	6.551	s		
8	6.590	s		
2'	7.328	d	2',6'	2
5'	7.049	d	5',6'	8.5
6'	7.475	dd		
OCH_3- an C-6	4.005	s		
OCH_3- an C-3'	4.045	s		

Aus den spektroskopischen Daten ist 33 eindeutig als Jaceosidin identifiziert, was durch Spektrenvergleich und Co-Chromatographie mit der Vergleichssubstanz in verschiedenen Fließmitteln bestätigt wurde.

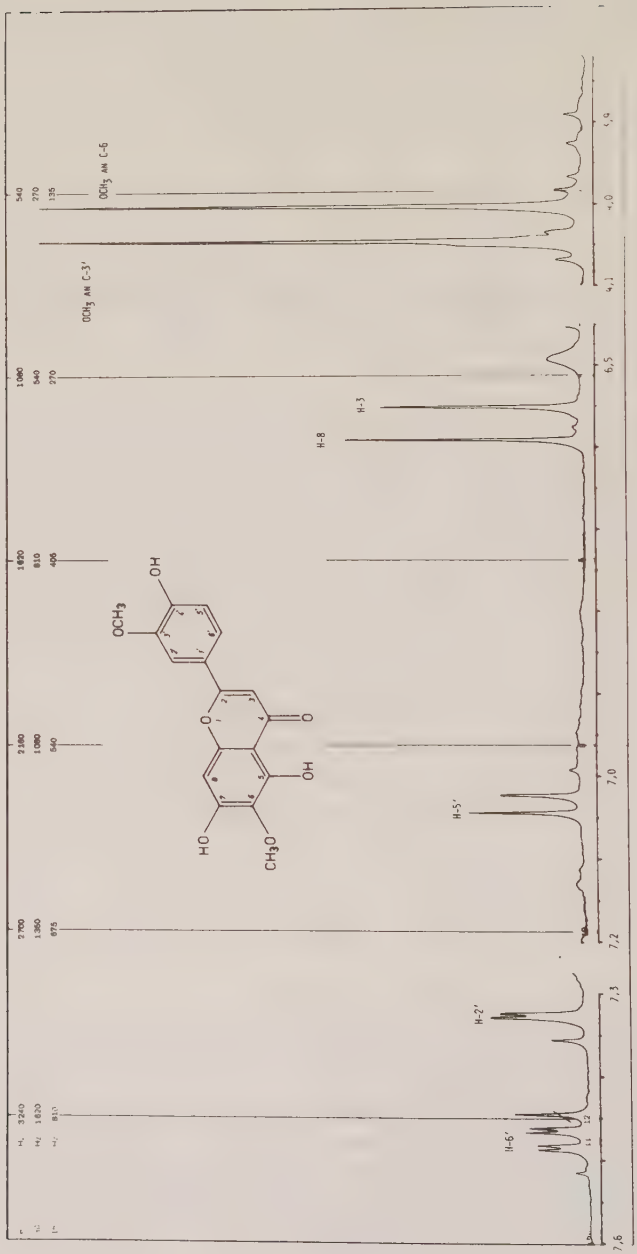
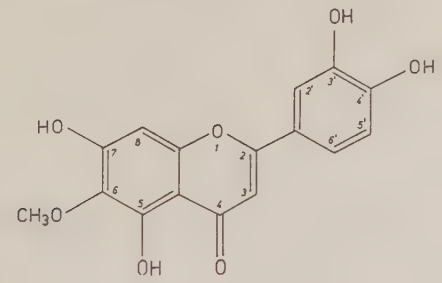


Abb. 86: ^{1}H-NMR-Spektrum von 33; δ-Skala (ppm)

Jaceosidin ist häufig in Asteraceen nachgewiesen worden [63,85] und scheint für die Gattung Arnica ebenfalls typisch zu sein (vgl. Tab. 3).

8.6. Nachweis von 34 (Eupafolin)



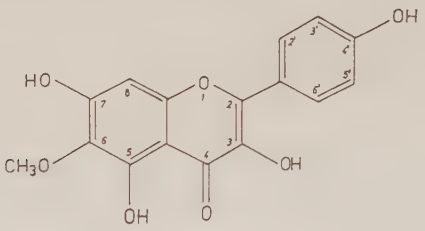
Eupafolin

In der Fraktion NC VI war dc ein in geringer Konzentration auftretendes Flavonoid zu detektieren, daß jedoch wegen geringer Substanzmenge nicht isoliert werden konnte (R_f 0,15; System 6, s. Abb. 77, S. 127). Da der R_f-Wert dieser Fl-Komponente im Vergleich zu den bisher diskutierten 30, 32 und 33 deutlich niedriger ist, sollte es sich um ein Flavon mit einer größeren Anzahl an freien OH-Gruppen handeln. Bei DC-Analysen mit authentischen Vergleichssubstanzen auf Polyamid- und Kieselgelplatten in mehreren Fließmittelsystemen erwies sich 34 als identisch mit Eupafolin (6-Methoxy-luteolin, Nepetin), das in der Gattung Arnica bereits gefunden worden ist (Tab. 3).

8.7. Isolierung von 35 und 36

In den Fraktionen N VI und NC VII wurden dc die Verbindungen 35 und 36 detektiert (Abb. 77, S. 127). Nach Trennung der beiden Flavonoide durch präparative DC an Kieselgelplatten im System 7 und üblicher Aufarbeitung (s. Kap. 12.4.2.) lagen beide Verbindungen dc einheitlich vor. Aufgrund der Ausbeute handelt es sich bei 35 um die Hauptkomponente der Flavonoide von A. nevadensis. Verbindung 36 konnte nur in relativ geringen Mengen isoliert werden.

8.7.1. Identifizierung von 35 (6-OMe-Kämpferol)



6-OMe-Kämpferol

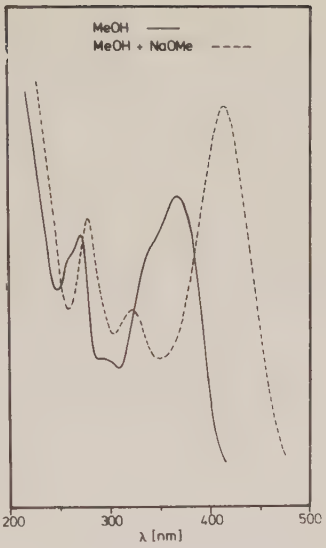
Die, wie bereits mehrfach beschrieben, durchgeführten UV-Analysen führten zu folgenden Strukturhinweisen:

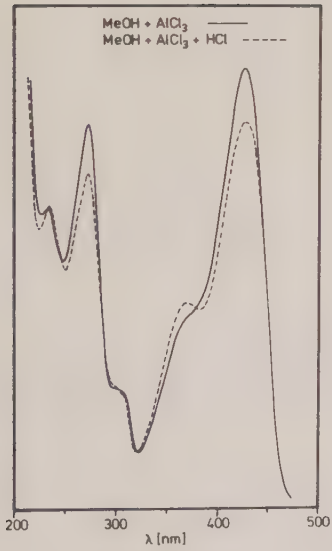
- MeOH: Die Absorptionskurve zeigt zwei Maxima bei 270 nm (Bande II) und 365 nm (Bande I). Durch die Lage der Bande I (>350 nm) wird 35 als Flavonol charakterisiert.
- NaOMe: Bande I wird unter Intensitätsanstieg bathochrom um 48 nm verschoben. Die Verbindung bleibt in Alkali nicht stabil und zeigt bereits nach fünf Minuten ein verändertes Spektrum. Dieses instabile Verhalten der Substanz weist auf das Vorliegen von vicinalen Dihydroxygruppen im Ring B hin, wogegen jedoch die gelbgrüne Fluoreszenz spricht, oder auf ein Flavonol mit 4'-OH- oder mit 3'-OMe,4'-OH-Substitution [93]. Das Vorliegen einer freien 7-Hydroxygruppe geht aus der Rotverschiebung der Bande II hervor und durch das Auftreten der Bande III bei 322 nm [127].
- NaOAc: Bestätigung der freien 7-OH-Gruppe
- NaOAc/H_3BO_3: Das Molekül enthält keine vicinalen OH-Gruppen.
- $AlCl_3$ und $AlCl_3$/HCl: Sowohl in neutraler als auch in saurer Lösung werden fast identisch UV-Spektren erhalten. Aus der bathochromen Verschiebung der Bande I von 60 bzw. 62 nm geht eindeutig hervor, daß die Hydroxygruppe an C-5 frei vorliegen muß.

Nach den UV-Analysen sollte es sich bei 35 um ein Flavonol mit Hydroxygruppen an C-5, C-7 und C-4' handeln.

Verbindung 35

MeOH	: 257 sh, 270, 295 sh, 336, 365
NaOMe	: 278, 322, 413
$AlCl_3$	: 235 sh, 272, 308 sh, 365 sh, 425
$AlCl_3$/HCl	: 235 sh, 272, 308 sh, 365, 427
NaOAc	: 275, 310, 390
NaOAc/H_3BO_3 (Proc. II)	: 257 sh, 270, 333, 370





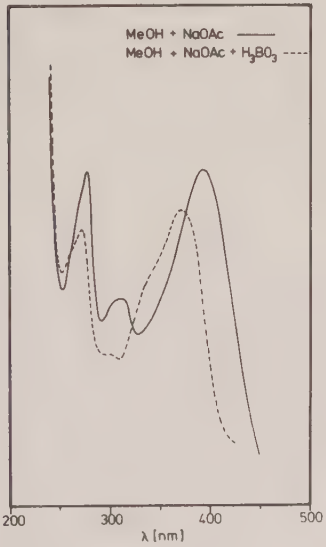


Abb. 87: UV-Spektren und λ_{max}-Werte [nm] von 35 (vgl. [235]; Abkürzungen nach [93])

Das MS-Spektrum (Abb. 88, Erklärung der Fragmentionen, s. Abb. 22, S. 44) zeigt einen Molekülpeak bei m/z 316. Das Auftreten des (M^+-15)-Fragmentes bei m/z 301 spricht für eine 6- oder 8-OMe-Substitution. Da der Molekülpeak jedoch gleichzeitig den Basispeak bildet und die (M^+-1)- und (M^+-15)-Bruchstücke kleiner als 10 % bzw. 30 % sind, sollte es sich um ein 5,7-Dihydroxy-6-methoxy-flavonol handeln [85]. Die Fragmente bei m/z 298 und 273 gehen durch Eliminierung von Wasser bzw. -COMe hervor. Das einzige A-Ringfragment tritt bei m/z 167 auf und ist durch Abspaltung von $-CH_3$ aus dem A_1-Fragment entstanden. Damit muß der A-Ring zwei OH- und eine OMe-Gruppe tragen. Erwartungsgemäß sind im Spektrum keine B_1-Fragmente zu erkennen. Die B_2-Fragmente bei m/z 121 (B_2^+) und 93 (B_2^+-CO) sind typisch für eine Monohydroxysubstitution des B-Ringes.

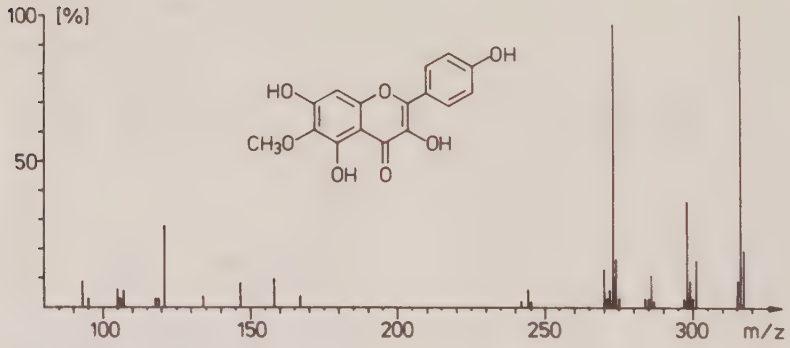


Abb. 88: MS-Spektrum von 35

Die ^{1}H-NMR-Daten (Abb. 89 und Tab. 23) beweisen die sich bereits aus den UV- und MS-Daten ergebene Struktur von 35 als 6-OMe-Kämpferol.

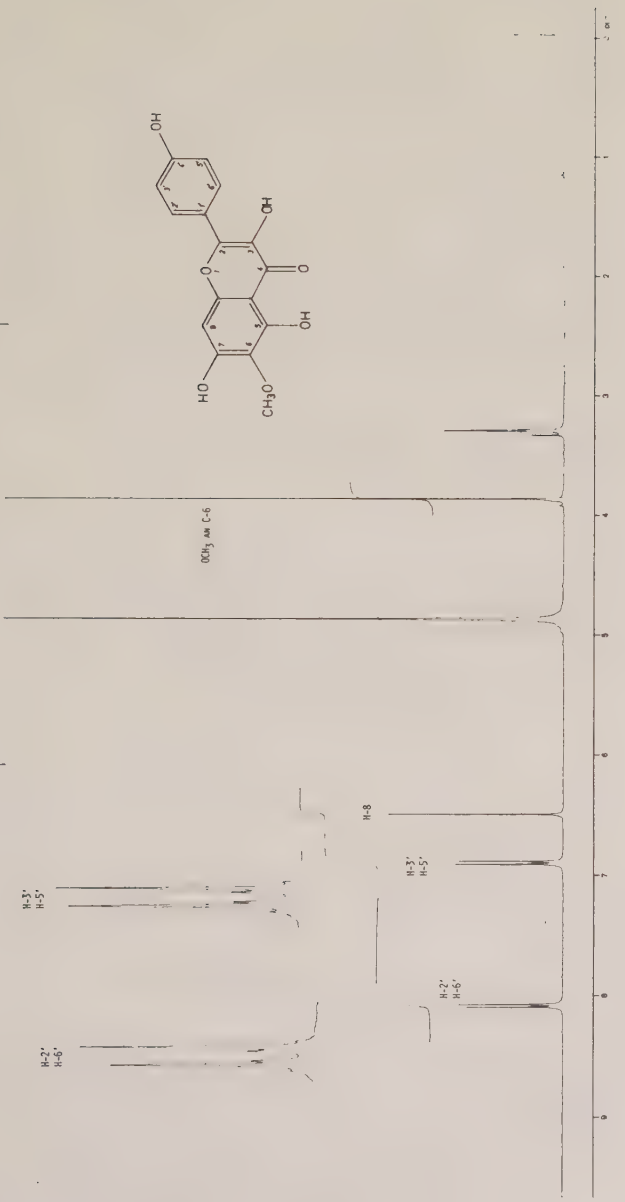


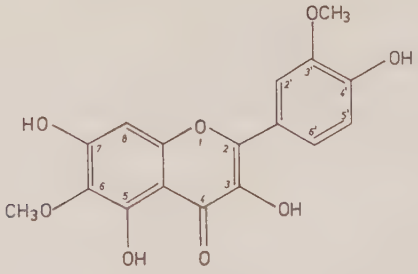
Abb. 89: ^{1}H-NMR-Spektrum von 35

Tab. 23: ^{1}H-NMR-Daten von 35 (6-OMe-Kämpferol); gemessen bei 360 MHz in Methanol-d_4

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
8	6.522	s		
2'/6'	8.113	d	2',3'	9
3'/5'	6.925	d	5',6'	9
CH_3O- an C-6	3.897	s		

Beim direkten DC-Vergleich in mehreren Fließmitteln und beim Vergleich der spektralen Daten mit 6-OMe-Kämpferol wurden keine Unterschiede zur isolierten Verbindung 35 festgestellt.

8.7.2. Identifizierung von 36 (Spinacetin)



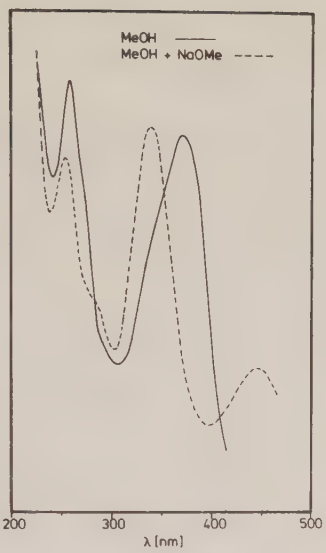
Spinacetin

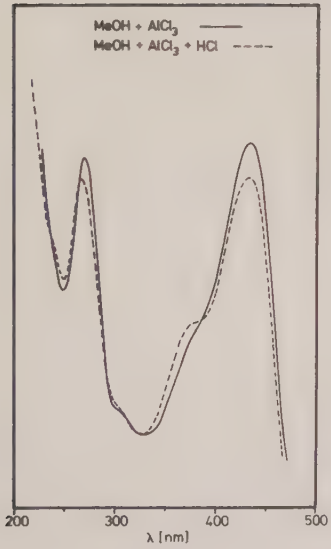
Die UV-Analyse von 36 (Abb. 90) und deren Auswertung nach Standardmethoden ([92,93], s. auch 6 und 35) ergab folgende Strukturhinweise:

- MeOH: Flavonol-Absorptionskurve mit Maxima bei 256 nm (Bande I) und 370 nm (Bande II)
- NaOMe: Bei sofortiger Messung ist eine bathochrome Verschiebung der Bande I bis 442 nm zu erkennen. Schon nach fünf Minuten ist diese Bande im Spektrum nicht mehr zu erkennen. Statt dessen erfährt die bei 338 nm auftretende Bande III eine starke Intensitätssteigerung. Daraus kann auf eine freie 4'- und 7-OH-Gruppe geschlossen werden.

Verbindung 36

MeOH	: 256, 370
NaOMe	: 254, 286 sh, 338, 442
$AlCl_3$	: 268, 305 sh, 370 sh, 432
$AlCl_3$/HCl	: 265, 305 sh, 370 sh, 430
NaOAc	: 269, 276 sh, 322, 394
NaOAc/H_3BO_3 (Proc. II)	: 258, 275 sh, 371





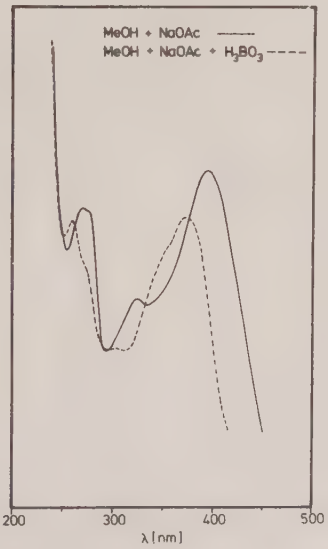


Abb. 90: UV-Spektren und λ_{max}-Werte [nm] von 36 (Abkürzungen nach [93])

- NaOAc: Bestätigung der 7-OH-Gruppe.
- NaOAc/H_3BO_3: Vicinale Dihydroxygruppen sind nicht im Molekül enthalten.
- $AlCl_3$ und $AlCl_3$/HCl: Durch den bathochromen Shift der Bande I wird das Vorliegen einer freien 5-OH-Gruppe belegt. Da die Absorptionskurve nach HCl-Zugabe nahezu identisch ist, wird die Abwesenheit von vicinalen Dihydroxygruppen bestätigt.

Aus diesen UV-Daten kann auf ein Flavonol mit Hydroxygruppen in 5,7, und 4'-Stellung geschlossen werden.

Die Art und die Zahl weiterer Substituenten kann dem ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 91; ^{1}H-NMR-Daten s. Tab. 24) entnommen werden. Dies zeigt für die Protonen des B-Ringes das Aufspaltungsmuster eines 3',4'-disubstituierten Ringes. Das Singulett bei δ = 6.530 ppm ist H-8 zuzuschreiben (s. auch 30-35). Da zwei Singuletts mit der Intensität dreier Protonen bei δ = 3.887 und 3.947 ppm in Resonanz treten, handelt es sich bei den weiteren Substituenten von 36 um Methoxygruppen.

Tab. 24: ^{1}H-NMR-Daten von 36 (Spinacetin); gemessen bei 360 MHz in Methanol-d_4

Protonen	δ (ppm)	Multiplizität	Protonen	J [Hz]
8	6.530	s		
2'	7.883	d	2',6'	2
5'	6.943	d	5',6'	8.5
6'	7.751	dd		
CH_3O- an C-6	3.887	s		
CH_3O- an C-3'	3.947	s		

Die Struktur dieser Verbindung ist damit mit 3,5,7,4'-Tetrahydroxy-6,3'-dimethoxy-flavon (Spinacetin) identisch. Durch den Vergleich der spektralen Daten und den direkten DC-Vergleich mit authentischem Spinacetin wurde die Struktur von 36 weiter abgesichert und das Vorliegen des isomeren Flavonols Laciniatin (3'-OH,4'-OMe) auch hierbei ausgeschlossen.

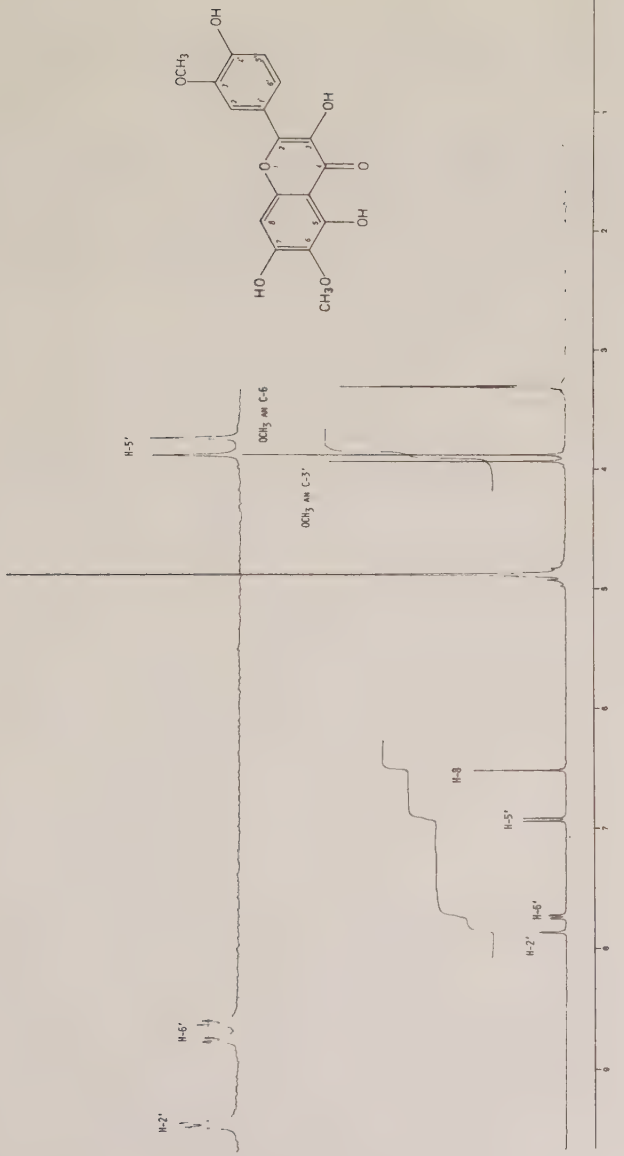


Abb. 91: ^{1}H-NMR-Spektrum von 36

Spinacetin ist schon häufiger in der Familie der Asteraceae [63,85] und auch in der Gattung Arnica identifiziert worden (s. Tab. 3).

8.8. Identifizierung von 14 (Quercetin) und 15 (Kämpferol)

Die in den Fraktionen N VII und NC VIII (s. Abb. 77, S. 127) vorliegenden beiden Flavonole wurden dc in mehreren Systemen als die ubiquitär vorkommenden Flavonole Quercetin und Kämpferol identifiziert. Zur Absicherung dieser Ergebnisse wurden beide Verbindungen durch präparative DC im System 6 isoliert und ihre UV-Spektren aufgenommen.

9. KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER IDENTIFIZIERTEN INHALTSSTOFFE VON A. NEVADENSIS A. GRAY

Aus den Blättern von A. nevadensis wurden vier Sesquiterpenlactone vom Eudesmanolid-Typ isoliert. Es handelt sich dabei um Ivalin (26) und dessen Essigsäureester (27) sowie um Asperilin (28) und 11α,13-Dihydroivalin (29). Hauptkomponente ist Ivalin, das in Spuren neben 7β,8β-Helenanoliden in A. chamissonis subsp. chamissonis gefunden wurde [39]. Die Verbindungen 27-29 sind als Inhaltsstoffe der Gattung Arnica noch nicht beschrieben worden. 11α,13-Dihydroivalin (29) wurde hier erstmals in einer Pflanze gefunden.

Aus der Stoffgruppe der Flavonoide wurden in den Blättern von A. nevadensis 10 Verbindungen isoliert und identifiziert. Es sind dies die Flavone Pectolinarigenin (30), Hispidulin (32), Jaceosidin (33), Eupafolin (34; nur dc), Cirsimaritin (13) und ein 5,6,7,3',4'-pentasubstituiertes Flavon (31) sowie die Flavonole 6-OMe-Kämpferol (35), Spinacetin (36), Quercetin (14) und Kämpferol (15).

10. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

In der vorliegenden Untersuchung wurden mit Arnica nevadensis und Arnica viscosa erstmals die Sesquiterpenlactone zweier Arnica-Arten analysiert, die von Maguire [12], Cronquist [236], Ediger und Barkley [237] sowie Wolf u. Denford [24] in den Subgenus Austromontana eingegliedert werden. Im Kraut von A. viscosa wurden fünf Sesquiterpenlactone nachgewiesen und nach Isolierung spektroskopisch als 11α,13-Dihydrohelenalin (2), 6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalin (= Arnicolid A) (1), 2β-Hydroxy-6-O-acetyltetrahydrohelenalin (3), Helenalin (4) und 6-O-Acetylhelenalin (5) identifiziert. Hauptkomponente war Arnicolid A. Die 2β-Hydroxyverbindung ist ein neuer Naturstoff, der bisher noch nicht beschrieben worden ist. Möglicherweise handelt es sich bei ihm um eine biosynthetische Vorstufe von Arnicolid A, wie dies von Bohlmann [79] entsprechend für das 2β-Hydroxy-2,3-dihydroderivat von 6-O-Methacryloyl-helenalin angenommen wird. Eine getrennt durchgeführte Analyse der Blütenkörbchen ergab, daß sich diese in der Sesquiterpenlactonführung nicht vom Kraut unterscheiden. Lediglich Verbindung 3 konnte hier nicht nachgewiesen werden.

In den Blättern von A. nevadensis konnten dagegen keine Sesquiterpenlactone vom Pseudoguaianolid-Typ nachgewiesen werden. Bei den hier auftretenden vier Sesquiterpenlactonen handelt es sich um Eudesmanolide, die spektroskopisch als Ivalin (26), 2-O-Acetylivalin (27), 11α,13-Dihydroivalin (29) und Asperilin (28) identifiziert wurden. Hauptkomponente war das Alantolid Ivalin (26), das als bisher einziges Eudesmanolid der Gattung Arnica in Spuren neben 7β,8β-Helenanoliden in A. chamissonis gefunden worden ist [39]. Das natürliche Vorkommen des isolierten 11α,13-Dihydroivalins ist bisher noch nicht beschrieben worden. Es wurde jedoch bereits für pharmakologische Zwecke aus Ivalin hergestellt [227,228].

Die hier nachgewiesene unterschiedliche Sesquiterpenlactonführung der beiden analysierten Arnica-Arten unterstützt ihre von Maguire [12] vorgenommene Einordnung in unterschiedliche Sektionen der Untergattung Austromontana (s. Tab. 1, S.2) und widerspricht vorläufig der Auffassung von Wolf u. Denford [24],

die eine Sektioneneinteilung dieses Subgenus wegen fehlender ausreichend differenzierender Merkmale nicht für gerechtfertigt halten. Obwohl beide Arnica-Arten nur in einem geographisch relativ eng begrenzten Gebiet vorkommen, sollten vor einer endgültigen Aussage noch weitere Herkünfte und auch weitere Arten des Subgenus Austromontana analysiert werden, um zu prüfen, ob 1. das bei den aufgearbeiteten Pflanzen gefundene Sesquiterpenlactonmuster für die jeweilige Art durchgehend charakteristisch ist und ob 2. das stark voneinander abweichende Sesquiterpenlactonmuster der beiden Arten, zumindest im Grundsätzlichen, jeweils auch charakteristisch ist für alle Arten der beiden Sektionen.

Eine herkunftsbedingte Variabilität des Sl-Komponentenspektrums ist für Asteraceen mit weiter geographischer Verbreitung schon mehrfach beschrieben worden [u.a. 42,118,123,238,239], wobei in der Regel jedoch nur unterschiedliche Verbindungen vom gleichen Strukturtyp gefunden wurden. Bei Gaillardia pulchella jedoch wurden in Pflanzen verschiedener geographischer Herkunft Guaianolide, Pseudoguaianolide oder auch nur Eudesmanolide gefunden [22].

Die zum Subgenus Austromontana, Sektion Eradiata bzw. Eulatifolia, gehörenden beiden aufgearbeiteten Arnica-Arten unterscheiden sich in ihrer Sl-Führung nicht nur untereinander, sondern auch von den bisher untersuchten Arnica-Arten aus den Subgenera Montana (A. montana: Helenalin-Derivate), Chamissonis (A. chamissonis, Sektion Euchamissonis: Helenalin- und Chamissonolid-Derivate; A. longifolia, Sektion Eulongifolia: Helenalin-Derivate und Xanthanolide) und Andropurpurea (A. sachalinensis: keine Sesquiterpenlactone) (s. Tab. 2, S. 6), so daß die von Maguire vorgenommene taxonomische Gliederung der Gattung Arnica (s. Tab. 1, S. 2) nach dem gegenwärtigen Stand auch die Variation in der Sl-Führung widerspiegelt. A. viscosa führt mit Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin sowie deren 6-O-Acetylderivaten zwar die für A. montana charakteristischen Helenanolide, ohne jedoch die dort als Hauptkomponenten auftretenden Ester mit gesättigten und ungesättigten C_4- und C_5-Säuren zu bilden.

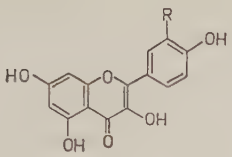
Besonderes Augenmerk verdient der Nachweis, daß in der Gattung Arnica mit A. nevadensis zumindest eine Art existiert, die nur Eudesmanolide führt, die über einen anderen Biosyntheseweg gebildet werden als die Helenanolide und Xanthanolide der Gattung (s. Abb. 4, S. 12). Dies läßt vermuten, daß es sich bei der Gattung Arnica um eine recht ursprüngliche Sippe handelt, zumal die in A. longifolia parallel auftretenden Helenanolide (10α-CH_3) und Xanthanolide (10β-CH_3) nach den bisherigen Vorstellungen ebenfalls auf verschiedenen Biosynthesewegen gebildet werden (s. Kap. 2, Abb. 5, S. 13). In chemotaxonomischer Hinsicht unterstützen die Ergebnisse zur Sl-Führung in A. viscosa und A. nevadensis weiterhin die erfolgte Eingliederung der Gattung Arnica in die Tribus Heliantheae [15,20], in der für die Gattung Helenium bereits das gleichwertige Auftreten von Helenanoliden, Xanthanoliden und Eudesmanoliden beschrieben worden ist [22].

Die Analyse der nicht glykosidisch gebundenen Flavonoide des Krautes und der Blütenkörbchen von A. viscosa führte zur Isolierung und Identifzierung (UV-, MS-, ^{1}H-NMR-Daten) von zehn Verbindungen (6-15, s. Abb. 92, S. 157), die mit Ausnahme der ubiquitären Flavonole Quercetin (14) und Kämpferol (15) bis dahin für die Gattung Arnica noch nicht beschrieben worden waren. Es handelt sich bei ihnen um Flavanone und Flavone, die als gemeinsames Merkmal alle an C-7 eine Methoxygruppe tragen und mit Ausnahme von Cirsimaritin (13) an C-6 nicht substituiert sind.

Zwei der drei isolierten Flavanone (8 und 10) besitzen dasselbe Substitutionsmuster wie die daneben isolierten Flavone 6 und 7, was aus biosynthetischen Gründen erwartet werden darf. Auffallend ist jedoch, daß das korrespondierende Flavon Pilloin (Luteolin-7,4'-dimethylether) zum dritten Flavanon (9, Persicogenin) nicht nachgewiesen werden konnte. Statt dessen tritt bei den Flavonen das Stellungisomere Velutin (12) auf (3'-OMe,4'-OH statt 4'-OMe,3'-OH). Die unterschiedliche Methylierung des B-Ringes ist möglicherweise ein Indiz dafür, daß die Methylierung der Hydroxygruppen durch spezifische 3'- bzw. 4'-O-Methyltransferasen nach Ausbildung der Grundstruktur erfolgen kann.

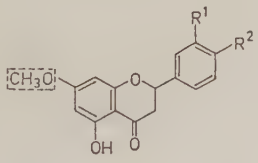
A. viscosa

A. nevadensis



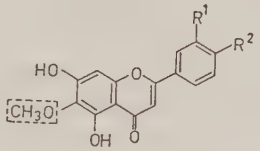
Flavonole

14 : R = OH
15 : R = H



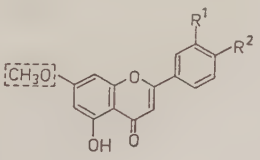
Flavanone

8 : R^1 = H; R^2 = OCH_3
9 : R^1 = OH; R^2 = OCH_3
10 : R^1 = H; R^2 = OH



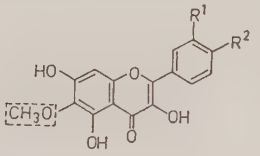
Flavone

30 : R^1 = H; R^2 = OCH_3
31 : R^1 = OCH_3; R^2 = OH und 7-OCH_3*
32 : R^1 = H; R^2 = OH
33 : R^1 = OCH_3; R^2 = OH
34 : R^1 = OH; R^2 = OH



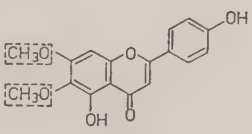
Flavone

6 : R^1 = H; R^2 = OCH_3
7 : R^1 = H; R^2 = OH
11 : R^1 = R^2 = OCH_3
12 : R^1 = OCH_3; R^2 = OH



Flavonole

35 : R^1 = H; R^2 = OH
36 : R^1 = OCH_3; R^2 = OH



Flavon

13 : Cirsimaritin

* wahrscheinlich

Abb. 92: Identifizierte Flavonoide aus A. viscosa und A. nevadensis

Aus den Blättern von A. nevadensis wurden ebenfalls zehn Flavonoidaglyka isoliert und identifiziert (Verbindungen 13-15 und 30-36, s. Abb. 92). Abgesehen von Kämpferol und Quercetin handelt es sich bei ihnen durchgehend um 6-Methoxy-Flavone und 6-Methoxy-Flavonole mit freier OH-Gruppe an C-7, die bereits in A. montana und A. chamissonis nachgewiesen worden sind (s. Tab. 3, S. 8). Eine Ausnahme bildet auch hier Cirsimaritin (13), das wie die A. viscosa-Flavonoide zusätzlich an C-7 eine Methoxygruppe trägt. Flavanone konnten hier nicht nachgewiesen werden.

Die beiden aufgearbeiteten Arnica-Arten unterscheiden sich somit ganz charakteristisch auch in ihrer Flavonoidführung (s. Abb. 92). Unter den bereits bei der Diskussion ihrer unterschiedlichen Sesquiterpenlactonprofile angeführten Voraussetzungen und Vorbehalte würde dies ihre taxonomische Eingliederung in verschiedene Sektionen des Subgenus Austromontana rechtfertigen.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den während der vorliegenden Untersuchungen erschienenen Arbeiten von Wolf u. Denford [24,25,160], die u.a. auch aufgrund einer Analyse der Flavonoidführung, die von Maguire vollzogene Untergliederung des Subgenus Austromontana in die beiden Sektionen Eulatifolia und Eradiata für künstlich halten. Von den in der vorliegenden Arbeit identifizierten Flavonoidaglyka der A. nevadensis fanden Wolf u. Denford [25] in zwei von ihnen untersuchten Pflanzenherkünften lediglich Hispidulin (32) und Eupafolin (6-Methoxyluteolin, 34) sowie darüber hinaus Diosmetin, das in den hier aufgearbeiteten Pflanzen nicht gefunden wurde. In zwei untersuchten Herkünften von A. viscosa beschreiben Wolf u. Denford [25] sieben Flavonoidaglyka, von denen lediglich zwei Verbindungen (Genkwanin, 7 und Cirsimaritin, 13) auch in den Pflanzen der hier untersuchten Herkunft gefunden wurden. Bei den anderen fünf von den Autoren identifizierten Flavonoidaglyka handelte es sich um die an C-6 substituierten Verbindungen Hispidulin (32), das 6-Hydroxy-, 6,4'-Dimethoxy- und 6,7,4'-Trimethoxy-luteolin (= Cirsilineol) sowie das 6,3'-Dimethoxyquercetin (= Spinacetin, 36). Die in den hier aufgearbeiteten A. viscosa-Pflanzen identifizierten 7-Methoxyfla-

vanone und -flavone 6 und 8 bis 12 wurden bisher noch in keiner weiteren Arnica-Species gefunden.

Aus der sich bereits aus diesen Untersuchungen abzeichnenden herkunftsbedingten Variabilität der Flavonoidführung innerhalb einer Arnica-Art geht hervor, daß für nützliche taxonomische Schlußfolgerungen weitere Untersuchungen in diesem Bereich durchgeführt werden müssen.

Vergleicht man die Sesquiterpenlacton- und Flavonoidführung der beiden untersuchten Arnica-Arten mit derjenigen von A. montana, dann findet man im Sesquiterpenlactonmuster Ähnlichkeiten zwischen A. viscosa und A. montana (beide führen 7β,8β-Helenanolide) bei gleichzeitig auftretenden großen Unterschieden in den Flavonoidprofilen (A. viscosa: 7-Methoxyverbindungen; A. montana: 6-Methoxyverbindungen, s. Tab. 3). A. nevadensis und A. montana besitzen andererseits ein ähnliches Flavonoidspektrum, unterscheiden sich jedoch grundlegend in ihrer Sesquiterpenlactonführung (Eudesmanolide bzw. Helenanolide).

Wie bei den Sesquiterpenlactonen finden sich auch größere Übereinstimmungen in Gehalt und Zusammensetzung des ätherischen Öls der Rhizome von A. viscosa mit A. montana als mit den Rhizomölen der bisher untersuchten Arnica-Arten [7,204]. Die Rhizome der in der vorliegenden Arbeit analysierten A. viscosa-Pflanzen enthielten 3,55 % ätherisches Öl, wobei der 6-Hydroxy-thymoldimethylether (20) und der Thymolisobuttersäureester (19) mit 50 bzw. 36 % die Hauptkomponenten stellen. Als weitere Komponenten wurden durch GC/MS-Analyse Thymol (17), Thymolmethylether (18), Thymol-2-methylbuttersäureester (21) und -3-methylbuttersäureester (22) sowie Caryophyllenoxid (23) identifiziert. Der Anteil der identifizierten Bestandteile (Strukturformeln s. Abb. 57, S. 97) am Gesamtöl beträgt etwa 97 %.

Anders als bei A. montana lassen sich im Blatt- und Blütenöl von A. viscosa (0,14 bzw. 0,10 %) keine Thymolderivate nachweisen. Als Hauptkomponente des Blattöls (48 %) wurde der Sesquiterpenalkohol T-Muurolol (24; s. S. 98) identifiziert, der als Hauptkomponente im ätherischen Öl der Rhizome von A.

longifolia auftritt [69]. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob auch das Muster der in der Gattung verbreiteten Thymolderivate und auch das Auftreten spezifischer Sesquiterpenalkohole als hilfreiche Merkmalsquelle für eine taxonomische Gliederung der Gattung und für eine endgültige Einordnung in eine Tribus der großen Familie der Asteraceae herangezogen werden können.

11. ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus dem Kraut von A. viscosa wurden die Pseudoguaianolide 11α,13-Dihydrohelenalin (2), 6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalin (1) und 2β-Hydroxy-6-O-acetyl-2,3,11α,13-tetrahydrohelenalin (3) isoliert und ihre Struktur über die UV-, IR-, MS- und ^{1}H-NMR-Daten ermittelt. Bei 3 handelt es sich um einen bisher noch nicht beschriebenen Naturstoff. Als weitere Sesquiterpenlactone führt A. viscosa Helenalin (4) und 6-O-Acetylhelenalin (5), die durch DC-, GC- und GC/MS-Analyse identifiziert wurden.

2. Aus der Stoffgruppe der Flavonoide wurden acht lipophile Flavonoidaglyka isoliert. Es sind dies die Flavone Apigenin-7,4'-dimethylether (6), Genkwanin (7), Luteolin-7,3'-dimethylether (12), Luteolin-7,3',4'-trimethylether (11) und Cirsimaritin (13) sowie die Flavanone Naringenin-7,4'-dimethylether (8), Persicogenin (9) und Sakuranetin (10). Als gemeinsames Merkmal besitzen alle Verbindungen eine 5-OH-, 7-OCH_3-Substitution am A-Ring. Lediglich Cirsimaritin trägt an C-6 zusätzlich eine Methoxygruppe. Mit Ausnahme von Genkwanin (7) und Cirsimaritin (13) sind diese Verbindungen in der Gattung Arnica noch nicht gefunden worden.

3. Die Blütenkörbchen von A. viscosa unterscheiden sich in ihrer Sesquiterpenlacton- und Flavonoidführung praktisch nicht vom Kraut. Zusätzlich wurden hier die ubiquitär vorkommenden Flavonole Quercetin (14) und Kämpferol (15) identifiziert.

4. In den Rhizomen, Blättern und Blütenkörbchen von A. viscosa wurden 3,55, 0,14 bzw. 0,10 % ätherisches Öl gefunden. Die chemische Zusammensetzung des Rhizomöls wurde durch DC-, GC- und GC/MS-Analyse aufgeklärt. Im direkten Vergleich mit den jeweiligen Verbindungen wurden Thymol (17), Thymolmethylether (18), 6-Hydroxythymoldimethylether (20), Thymolisobuttersäureester (19), Thymol-2-methylbuttersäureester (21), Thymolisovaleriansäureester (22) und Caryophyllenoxid (23) identifiziert, die insgesamt ca. 97 % des Gesamtöls stellen. Hauptkomponenten sind der 6-Hydroxythymoldimethylether (ca. 50 %) und der Thymolisobuttersäureester (ca.

36 %). Hauptbestandteil des Blattöls ist der Sesquiterpenalkohol T-Muurolol (ca. 48 %), der auch im Blütenöl (ca. 11 %) nachgewiesen wurde.

5. Die Sesquiterpenlactone der Blätter von Arnica nevadensis wurden nach ihrer Isolierung durch UV-, IR-, MS- und ^{1}H-NMR-Analyse als die Eudesmanolide Ivalin (26), 2-O-Acetylivalin (27), Asperilin (28) und 11α,13-Dihydroivalin (29) identifiziert. Das Vorkommen von 27 und 28 wird erstmalig für die Gattung Arnica beschrieben. Bei Verbindung 29 handelt es sich um einen neuen Naturstoff.

6. Aus den Blättern von A. nevadensis wurden zehn Flavonoidaglyka isoliert und über ihre spektralen Daten (UV, MS, ^{1}H-NMR) identifiziert. Es handelt sich bei ihnen um die Flavone Pectolinarigenin (30), Hispidulin (32), Jaceosidin (33), Eupafolin (34, nur dc), Cirsimaritin (13) und ein 5,6,7,3',4'-pentasubstituiertes Flavon mit zwei OH- und drei CH_3O-Gruppen (wahrscheinlich Cirsilineol) sowie um die Flavonole Quercetin (14), Kämpferol (15), 6-Methoxykämpferol (35) und Spinacetin (36). Als gemeinsames Merkmal besitzen alle Verbindungen, mit Ausnahme des ubiquitären Quercetins und Kämpferols einen 5-OH-, 6-OCH_3-, 7-OH-substituierten A-Ring. Lediglich Cirsimaritin ist zusätzlich an C-7 verethert.

7. Die taxonomische Gliederung der Gattung Arnica und ihre systematische Stellung innerhalb der Asteraceen wird vor dem Hintergrund der identifizierten Sesquiterpenlactone und Flavonoide diskutiert.

12. EXPERIMENTELLER TEIL

12.1. Herkunft, Ernte, Trocknung und Lagerung des untersuchten Pflanzenmaterials

12.1.1. Arnica viscosa A. Gray

Das Pflanzenmaterial von A. viscosa wurde im Juli 1979 am natürlichen Wuchsort in Nordamerika am Mt. Shasta, Kalifornien in ca. 3500 m Höhe gesammelt. Es wurde zuerst an der Luft getrocknet und später im Trockenschrank bei 40°C nachgetrocknet. Bis zur Aufarbeitung lagerte die Droge trocken bei +5°C in Papiertüten.

12.1.2. Arnica nevadensis A. Gray

Die Blätter von A. nevadensis wurden im Juli 1979 in Nordamerika am Brokeoff Mountain im Lassen Volcanic National Park (Nähe Redding, Kalifornien) in ca. 2700 m Höhe gesammelt. Die Droge wurde an der Luft getrocknet und bei 40°C im Trockenschrank nachgetrocknet. Bis zur Extraktion wurde das Material bei +5°C in Papiertüten trocken aufbewahrt.

12.2. Spektroskopische Methoden

Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgte mit dem Spektralphotometer Typ DB-G der Firma BECKMAN bei Raumtemperatur in Methanol (Uvasol).

Die IR-Spektren wurden mit dem Spektralphotometer 297 der Firma PERKIN-ELMER in KBr (Preßlinge) bzw. mit dem NICOLET FT-IR, Modell 7199 als Film auf KBr* aufgenommen.

---

* Herrn Dr. Bayer, Zentralbereich Forschung und Entwicklung der Bayer AG Leverkusen, danke ich für die Aufnahme der Spektren der Verbindungen 28 und 29

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte unter GC/MS-Kopplung (Elektronenstoßionisation, Ionisierungsenergie 70 eV) mit dem Gaschromatograph Typ 2700 und Massenspektrometer MAT CH 7 A der Firma Varian oder durch Direkteinlaß mit dem Massenspektrometer Typ Varian MAT CH 5 (Ionisierungsenergie 70 eV) aufgenommen.*

Die ^{1}H-NMR-Spektren wurden mit dem Spektrometer WM-400 bzw. WH-360 der Firma BRUKER-PHYSIK aufgenommen. Die Aufnahme der ^{13}C-Spektren erfolgte mit dem Spektrometer WH-360 der Firma BRUKER-PHYSIK (90,52 MHz, PFT-Verfahren).** Die chemischen Verschiebungen (δ-Werte) sind in ppm und die Kopplungskonstanten (J-Werte) als Absolutbeträge in Hz angegeben. Als innerer Standard diente Tetramethylsilan (TMS).

12.3. Bestimmung der physikalischen Konstanten

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroskopheiztisch LEITZ Typ 350 bestimmt. Die Werte sind unkorrigiert.

Die Elementaranalyse wurde mit dem Gerät 240 der Firma PERKIN-ELMER durchgeführt.***

---

* Herrn Dr. U. Matthiesen, Institut für Physiologische Chemie II und Herrn Bürgel, Institut für Anorganische Chemie der Universität Düsseldorf danke ich für die Aufnahmen der Massenspektren.

** Für die Aufnahme der 400-MHz-Spektren danke ich Herrn Prof. Dr. H. Bornowski und Herrn Dr. F. Reimann, Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Berlin, für die 360-MHz-Spektren und seine Hilfe bei der Interpretation Herrn Dr. D. Wendisch, Zentralbereich Forschung und Entwicklung der Bayer AG Leverkusen.

*** Frau E. Lip, Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Düsseldorf, danke ich für die Durchführung der CH-Analysen.

12.4. Chromatographische Methoden

12.4.1. Dünnschichtchromatographie

Für die analytische DC wurden Kieselgel 60 F_{254}- bzw. Polyamid 11 F_{254}-Fertigplatten der Firma Merck verwendet.

Die präparative DC erfolgte an selbstgestrichenen Kieselgel 60 - Platten (Schichtdicke: 0,5 cm, Kieselgel 60 PF_{254}) oder an Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten (Schichtdicke: 0,25 cm) der Firma Merck. Die Fraktionen wurden mit dem Autoliner der Firma DESAGA, nach vorhergehender Reinigung über eine Filterspritze aufgetragen. Zur Aufarbeitung siehe 12.4.2.

Die Laufhöhe variierte je nach Trennproblem zwischen 10 und 18 cm (Kammersättigung, je nach Trennproblem mit oder ohne Filterpapier). Die Verhältnisangaben bei den Fließmittelgemischen beziehen sich jeweils auf Volumenteile.

System 1: n-Pentan/Diethylether (25:75)
System 2: n-Pentan/Diethylether (32:68)
System 3: n-Pentan/Diethylether (5:95)
System 4: n-Hexan/Isopropanol (77:23)
System 5: Chloroform/Aceton (6:1)
System 6: Chloroform/Methanol (15:1)
System 7: Methylenchlorid/Methanol (15:1)
System 8: Methylenchlorid/Methanol (10:1)
System 9: Toluol/Methanol/Methylethylketon/ Acetylaceton (40:30:20:10)
System 10: Toluol/Methylethylketon/Methanol (60:25:15)
System 11: Petrolether (40-60°C)/Diethylether (9:1)
System 12: Petrolether (40-60°C)/Ethylacetat/Toluol (80:15:5)
System 13: n-Hexan/Eisessig/Ethylacetat (85:10:5)

Die Systeme 1-5 eigneten sich besonders gut zur Auftrennung der S1-Extrakte. Die Systeme 6-10 wurden zur Auftrennung der F1-Fraktionen herangezogen und die Systeme 11-13 dienten ausschließlich zur Auftrennung der ätherischen Öle.

Folgende Sprühreagenzien wurden verwendet:

a) Zimmermann-Reagenz

Lösung A: 10 g 1,3-Dinitrobenzol + 90 ml Toluol
Lösung B: 6 g Natriumhydroxid + 25 ml Wasser + 45 ml Methanol

Die Platte wird zunächst mit Lösung A und anschließend mit Lösung B jeweils kräftig besprüht. Die Helenalin- und Dihydrohelenalinderivate reagieren unter Rotviolettfärbung.

b) Hydroxylamin/Eisen-III-chlorid-Reagenz

Lösung A: 10 g Hydroxylaminhydrochlorid + 90 ml Wasser
Lösung B: 20 g Natriumhydroxid + 80 ml Wasser
Lösung C: 2 g Eisen-III-chlorid + 20 ml Salzsäure (37 %)
+ 78 ml Wasser

Die Lösungen A und B werden im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach vorsichtigem Besprühen mit diesem Gemisch wird die Platte ca. 10 Minuten bei 100-110°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird sie mit Lösung C besprüht, wobei sämtliche Phenole und Sl unter Braunfärbung reagieren.

c) Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz

1 ml Anisaldehyd + 97 ml Essigsäure (99-100 %) + 2 ml Schwefelsäure (95-97 %)

Nach Besprühen wird bis zur Farbdifferenzierung ca. 5 bis 10 Minuten bei 100-110°C erhitzt. Dabei reagieren die Helenalinderivate (1-5) unter Gelbfärbung, die Eudesmanolide (26-29) unter Rotviolett bzw. Blaufärbung und die Flavanone sowie Thymol und dessen Derivate unter Orangefärbung.

d) Naturstoffreagenz A

Lösung A: 1 % Diphenylborsäureethanolaminester in Methanol
Lösung B: 5 % Polyglykol 400 in Ethanol

Nach Besprühen mit Lösung A wird sofort mit Lösung B nachgesprüht. Unter UV (365 nm) fluoreszieren die Flavone und Flavonole (6,7,11,12,15,34-36) grüngelb bis gelb, gelb bis orange (14) und die Flavanone (8-10) leicht gelblich. Einige der 6-OMe-Flavonoide zeigten Fluoreszenzlöschung (13,30-33).

e) Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz

1 g Vanillin + 100 ml Schwefelsäure (95-97 %)

Nach Besprühen wird die DC-Platte bis zur optimalen Farbintensität ca. 5 bis 10 Minuten bei 100-110°C erhitzt.

12.4.2. Aufarbeitung der Substanzen nach präparativer DC

Die getrennten Substanzzonen wurden unter UV-Licht (254 nm) markiert und vorsichtig ausgekratzt. Dieses feine Kieselgel-Substanzgemisch wurde im Verhältnis 1:1 mit Kieselgel 60 (für die SC, 35-70 mesh) gemischt und in eine Säule (Ø richtete sich nach Bedarf), in der sich bereits eine ca. 2 cm hohe Schicht von Kieselgel 60 (für die SC, 70-230 mesh) und ein Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch befanden, eingestreut. Die Polarität des Elutionsmittels war jeweils gegen über dem zur DC-Trennung benutzten Fließmittelgemisch geringfügig erhöht. Nach Elution der Substanzen wurden diese zur Entfernung von Kieselgelresten auf eine kleine Säule mit Sephadex LH 20 gegeben und mit Methanol eluiert. Die Auftragung erfolgte mit dem Autoliner der Firma DESAGA.

12.4.3. Säulenchromatographie

Zur Fraktionierung der Rohextrakte und zur Reinigung der Substanzen nach der präparativen DC wurde Sephadex LH 20 der Firma Pharmacia verwendet. Vor der Säulenfüllung wurde das Gel 24 Stunden lang im Elutionsmittel vorgequollen. Die Füllung der Säule erfolgte durch Einschlämmen des Gels. Die Substanzen- bzw. Substanzgemische wurden in wenig Elutionsmittel gelöst aufgegeben.

Weiterhin wurde Kieselgel 60 in den Korngrößen 70-230 und 230-400 mesh der Firma Merck benutzt. Auch hier erfolgte die Säulenfüllung durch Einschlämmen des Adsorbens. Das zu trennende Substanzgemisch wurde am Trägermaterial adsorbiert (1:1), auf die Säule gegeben und mit wenig Seesand p.a. abgedeckt.

12.4.3.1. Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie

Zur Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie wurde die Pumpe des präparativen HPLC 830-Gerätes der Firma DUPONT verwendet. Zur Erreichung des gewünschten niedrigen Drucks wurde zwischen Lobar-Säule und Pumpe eine analytische HPLC-Säule (Nucleosil 50-7) geschaltet. Als Trennsäule diente eine mit LiChroprep Si 60 selbstgefüllte Säule (Ø 1 cm, Lg. 50 cm) der Firma ALTEX.

12.4.3.2. Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Für die HPLC stand der Pumpenstand Serie 2/2 der Firma PERKIN-ELMER zur Verfügung, das Spektralphotometer LC 75 und der Recorder 561.

Als Trennsysteme wurden verwendet:

System 1: Säule Nucleosil 50-7, 0,4 cm x 25 cm (MACHERY & NAGEL); mobile Phase: n-Hexan/Isopropanol (variierende Zusammensetzung), Fluß 1,5 ml/Min.

System 2: Säule Polygosil 60 D 10 (MACHERY & NAGEL), 1,6 cm x 25 cm; mobile Phase: n-Hexan/Isopropanol (86:14), Fluß: 20 ml/Min.

Es wurde jeweils bei einer Wellenlänge von 225 nm detektiert.

12.4.4. Gaschromatographie

Verwendet wurden der Gaschromatograph F 22 der Firma PERKIN-ELMER mit FID und Recorder 56 sowie der Gaschromatograph 5710 A der Firma HEWLETT-PACKARD mit FID und Strip chart recorder 7123 A. Als Trägergas diente Stickstoff.

Trennsysteme:

System 1: Quarzkapillarsäule FS-OV-101, 25 m (MACHERY & NAGEL); Temperaturprogramm 150-250°C (2 Min. bei 150°C, Anstiegrate 10°C/Min.); Stickstoff 1,2 bar; Split 1:50; Injektor- und Detektortemperatur: 250°C

System 2: Säule wie bei System 1; Temperaturprogramm 100-250°C (2 Min. bei 100°C, Anstiegrate 4°C/Min.); sonstige Bedingungen siehe System 1

System 3: Quarzkapillarsäule FS-CW-20M, 25 m (MACHERY & NAGEL); Temperaturprogramm 80-200°C (2 Min. bei 80°C, Anstiegrate 4°C/Min.); Stickstoff 1,2 bar; Split 1:50; Injektor- und Detektortemperatur: 200°C

System 4: Säule wie bei System 3; Temperaturprogramm wie bei System 3; Helium 1 bar; Split 1:10; Injektor- und Detektortemperatur: 200°C

System 5: Glaskapillarsäule OV 1, 15 m (MACHERY & NAGEL); Temperaturprogramm 80-140°C (Anstiegrate 4°C/Min.), 140-250°C (Anstiegrate 8°C/Min.); weitere Bedingungen siehe System 4; Injektor- und Detektortemperatur: 250 bzw. 270°C

12.5. Synthese der Thymolester

12.5.1. Darstellung der Säurechloride

Die Darstellung der Säurechloride erfolgte nach einer Vorschrift des Organikums [240].

12.5.2. Darstellung der Thymolester

0,1 mol Thymol wurden in eine starke Natronlaugelösung eingerührt (0,12 mol NaOH in wenig Wasser). Zur Entfernung des Wassers wurden 150 ml Chlorbenzol zugefügt und bis zum wasserklaren Übergang destilliert. Nach Zugabe von 0,125 mol des entsprechenden Säurechlorids wurde 30 Minuten auf 130°C erwärmt. Das bei der Reaktion gebildete NaCl wurde abgenutscht, noch vorhandenes Lösungsmittel am Rotavapor abgezogen und der Ester im Vakuum destilliert.

Siedepunkte der Thymolester (Th-ester):

n-Buttersäure-Th-ester	: $Sdp._{18}$	= 141-142°C
Isobuttersäure-Th-ester	: $Sdp._{14}$	= 131-132°C
n-Valeriansäure-Th-ester	: $Sdp._{14}$	= 152-153°C
2-Methylbuttersäure-Th-ester	: $Sdp._{14}$	= 144-145°C
3-Methylbuttersäure-Th-ester	: $Sdp._{14}$	= 146°C

12.5.3. Synthese des Thymolmethylethers

Der Thymolmethylether wurde nach einer Vorschrift des Organikums hergestellt.
Sdp_{18}: 97°C

12.6. Derivatisierungen

12.6.1. Darstellung des Acetates von 12

10 mg Substanz wurden in 0,3 ml Pyridin gelöst und mit 0,1 ml Acetanhydrid und 1 Tropfen Schwefelsäure (konz.) versetzt. Anschließend wurde 3 Std. lang auf 60°C erwärmt und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Zur Aufarbeitung wurde die Lösung in Eis gekühlt und langsam mit Eiswasser versetzt. Das dabei weiß ausfallende Acetat wurde abgenutscht, mit wenig eiskaltem Diethylether (E) gewaschen und aus E/Aceton (1:1) in der Kälte ausgefällt, abgenutscht und über P_2O_5 getrocknet.
Ausbeute: 10 mg

12.6.2. Darstellung von 2-O-Acetyl-ivalin

Das Acetylderivat von Ivalin wurde in Anlehnung an [210] hergestellt. 10 mg Ivalin wurden in 0,4 ml Pyridin gelöst und mit 0,2 ml Acetanhydrid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 1 Std. lang auf 50°C erwärmt und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Lösung wurde eisgekühlt, langsam mit Eiswasser versetzt und das dabei ausfallende Ivalinacetat mit Chloroform extrahiert. Nach Waschen dieser Lösung mit 5 %iger Salzsäure und anschließendem Neutralwaschen mit Wasser wurde

das organische Lösungsmittel am Rotavapor abgezogen und das Acetat aus Diethylether in der Kälte auskristallisiert. Nach dem Abnutschen wurden die Kristalle über P_2O_5 getrocknet.
Ausbeute: 11 mg

12.7. Extraktion und Aufarbeitung des Krautes von Arnica viscosa

1070 g des getrockneten, gemahlenen Krautes wurden im Soxhletverfahren unter DC-Kontrolle, erschöpfend mit Chloroform extrahiert. Der Rückstand wurde mit 60 %igem Ethanol ausgezogen [36], der Alkohol im Vakuum abdestilliert und die milchigtrübe wäßrige Phase mit $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Nach Trocknen des Chloroformauszuges über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel entfernt und der grüne, ölige Rohextrakt über P_2O_5 getrocknet.
Rückstand: 122 g = 11,4 % der Droge

12.7.1. Gewinnung der Sesquiterpenlacton- und Flavonoid-Fraktion

Zur weiteren Reinigung wurde der Rohextrakt an Sephadex LH 20-Säulen aufgetrennt, wobei das Verhältnis Rohextrakt zu Gel jeweils ca. 1:20 betrug. Die aufgefangenen Teilfraktionen wurden nach DC-Überprüfung zu 4 Fraktionen vereinigt (s. Tab. 25).

Tab. 25: Ergebnis der sc Auftrennung von 98 g Rohextrakt aus A. viscosa (Kraut) an Sephadex LH 20; Säulenlänge: 90 cm; Säulendurchmesser: 3,5 cm; Elutionsmittel: Methanol; Volumen der Fraktionen: 30 ml

Fraktion	Menge [g]	ident. Verbindungen
SX I	68,43	--
SX II	13,88	1-5
SX III	5,62	--
SX IV	4,19	6-13

12.8. Fraktionierung der Sl-Fraktion

Die Sl-haltige Fraktion SX II des Rohextraktes wurde in drei gleichgroße Fraktionen geteilt, die jeweils an Kieselgelsäulen mit Elutionsmittelgemischen steigender Polarität aufgetrennt wurden. Die aufgefangenen Fraktionen (je 30 ml) wurden dc und gc untersucht und zu größeren Fraktionen vereinigt. Bedingungen und Ergebnisse der Trennungen sowie identifizierte Sl siehe Tabelle 26.

Tab. 26: Ergebnis der sc Auftrennung von 13,88 g der Sl-Fraktion SX II an 3 Kieselgelsäulen (je 380 g Kieselgel 60, 70-230 mesh, Säulenlänge: 85 cm, Säulendurchmesser: 3,5 cm); Abkürzungen der Lösungsmittel s. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.

Fraktionen	Menge [g]	Elutionsmittel	ident. Verb.
S I	2,83	PE/E (9:1-1:1)	--
S II	1,71	PE/E (1:1-3:7)	--
S III	0,12	PE/E (3:/-2:8)	1,5
S IV	2,33	PE/E (2:8-1:9)	1
S V	0,08	E	3,4
S VI	0,13	E	2
S VII	1,95	E/i-Prop (8:2)	--
Rest	3,14	M	--

12.8.1. Isolierung und analytische Daten von 1

Verbindung 1 wurde aus Fraktion S IV nach Zugabe von Diethylether auskristallisiert. Die noch leicht grün gefärbten Kristalle wurden mehrfach aus Diethylether umkristallisiert, abgenutscht, mit kaltem Pentan gewaschen und über P_2O_5 getrocknet. Die weißen Kristalle waren dc in mehreren Systemen und gc einheitlich.

Ausbeute: 1,1 g = 0,1 % des Drogentrockengewichtes

Analytische Daten von 1 (6-O-Acetyl-11α,13-dihydrohelenalin)

MS, m/z (rel. Int.): 306 (M^+;3), 264 (22), 246 (77), 231 (84), 173 (41), 148 (35), 145 (42), 124 (76), 123 (65), 122 (81), 121 (28), 119 (34), 96 (78), 55 (79), 43 (100)

Summenformel: $C_{17}H_{22}O_5$ (MG: 306)

Schmp.: 176-177°C ([103]: 177-178,5°C)

UV, λ_{max}: 227 nm

IR, υ [cm^{-1}]: 1770 (C=O, γ-Lacton), 1735 (C=O, Ester), 1705 (C=O, Cyclopentenon), 1575 (C=C, Cyclopentenon), 1240 (C-O, Ester)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 4, S. 23

DC: R_f-Werte in den Systemen 2 und 3: 0,27 und 0,55; positive Zimmermann-Reaktion; Gelbfärbung mit Anisaldehyd

GC, RT im System 1: 11,0 Min.

12.8.2. Isolierung und analytische Daten von 2

Verbindung 2 wurde nach Pentan-Zugabe zur etherischen Lösung von Fraktion S VI (bis zum Verhältnis 1:9) kristallin gewonnen. Nach mehrfachem Umkristallisieren aus Diethylether lag sie in Form weißer Kristalle dc und gc einheitlich vor.

Ausbeute: 19,8 mg = 0,002 % des Drogentrockengewichtes

Analytische Daten von 2 (11α,13-Dihydrohelenalin)

MS, m/z (rel. Int.): 264 (M^+;6), 246 (9), 236 (9), 231 (33), 191 (8), 137 (18), 124 (100), 123 (72), 122 (39), 107 (19), 96 (20), 95 (42), 71 (32), 69 (23), 67 (20), 55 (23)

Summenformel: $C_{15}H_{20}O_4$ (MG: 264)

Schmp.: 229-235°C (nach [36]: 230-235°C)

UV, λ_{max}: 228 nm

IR, υ [cm^{-1}]: 3490 (OH), 1748 (C=O, γ-Lacton), 1710 (C=O, Cyclopentenon), 1575 (C=C, Cyclopentenon)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 5, S. 25

DC, R_f-Werte in den Systemen 2 und 3: 0,1 bzw. 0,25; positive Zimmermann-Reaktion; Gelbfärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT im System 1: 8,0 Min.

12.8.3. Isolierung und analytische Daten von 3

Verbindung 3 wurde aus Fraktion S V mit Diethylether/Pentan (9:1) in der Kälte auskristallisiert. Wegen der geringen Mengen wurden die nur noch durch anhaftende Chlorophylle verunreinigten Kristalle nicht weiter umkristallisiert, sondern mit wenig eiskaltem Pentan gewaschen. Nach Trocknen über P_2O_5 lag 3 in Form fast weißer Kristalle vor.

Ausbeute: 2,2 mg

Analytische Daten von 3 (2β-Hydroxy-6-O-acetyl-11α,13-dihydrohelenalin)

MS, m/z (rel. Int.): 324 (M^+;1), 306 (1), 264 (15), 246 (36), 231 (17), 194 (54), 176 (8), 173 (9), 166 (18), 149 (18), 148 (17), 147 (18), 133 (21), 124 (16), 123 (20), 122 (24), 121 (75), 120 (51), 119 (28), 108 (12), 107 (64), 97 (9), 96 (8), 95 (31), 94 (11), 93 (19), 91 (14), 71 (22), 69 (21), 67 (15), 43 (100)

Summenformel: $C_{17}H_{24}O_6$ (MG: 324)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 6, S. 33

DC, R_f-Werte in den Systemen 2 und 3: 0,13 bzw. 0,35; positive Zimmermann-Reaktion; Gelbfärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT im System 1: 13,3 Min.

12.8.4. Identifizierung und analytische Daten von 4 und 5

Die Verbindungen 4 und 5 wurden nicht isoliert, sondern durch DC-, GC- und GC/MS-Analyse im direkten Vergleich mit den authentischen Verbindungen in den Fraktionen S III (5) und S V (4) identifiziert.

Analytische Daten von 4 (Helenalin)

MS, m/z (rel. Int.): 262 (M^+;3), 244 (4), 159 (5), 151 (13), 125 (7), 124 (100), 123 (50), 122 (13), 121 (12), 97 (13), 96 (54), 95 (32), 91 (14), 43 (33)

Summenformel: $C_{15}H_{18}O_4$ (MG: 262)

DC, R_f-Werte in den Systemen 2 und 3: 0,15 bzw. 0,45; positive Zimmermann-Reaktion; Gelbfärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT im System 1: 8,3 Min.

Analytische Daten von 5 (6-O-Acetyl-helenalin)

MS, m/z (rel. Int.): 262 (M^+-42;43), 245 (12), 244 (64), 234 (12), 229 (22), 216 (14), 174 (15), 173 (15), 172 (8), 151 (22), 145 (14), 138 (15), 135 (10), 125 (12), 124 (100), 123 (35), 122 (24), 121 (14), 119 (8), 117 (10), 107 (10), 105 (13), 97 (4), 96 (34), 95 (21), 93 (14), 91 (15), 67 (16), 54 (19), 43 (89)

Summenformel: $C_{17}H_{20}O_5$ (MG: 304)

DC, R_f-Werte in den Systemen 2 und 3: 0,38 bzw. 0,69; positive Zimmermann-Reaktion; Gelbfärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT im System 1: 10,8 Min.

12.9. Fraktionierung der Fl-Fraktion

Ein Teil der Flavonoid-Gesamtfraktion SX IV (s. Tab. 25, S. 171) wurde an Kieselgel mit $CHCl_3$ bzw. $CHCl_3$/Methanol-Gemischen eluotrop sc aufgetrennt. Die aufgefangenen Fraktionen (je 5 ml) wurden dc untersucht und zu größeren Fraktionen vereinigt. Die Bedingungen und Ergebnisse der Trennungen sowie die identifizierten Flavonoide sind der Tabelle 27 zu entnehmen.

Tab. 27: Ergebnisse der sc Auftrennung von 0,57 g der Fraktion SX IV an 60 g Kieselgel 60 (70-230 mesh; Säulenlänge: 40 cm, Säulendurchmesser: 2,5 cm); Auffangvolumen: 15 ml

Fraktionen	Menge [g]	Elutionsmittel	ident. Verb.
SF I/1	0,007	C	--
SF I/2	0,022	C	8
SF I/3	0,053	C	6
SF I/4	0,351	C	7, 9, 10-12
SF I/5	0,015	C	7
SF I/6	0,011	C/M (30:1)	7, 13
SF I/7	0,030	C/M (15:1)	--
Rest	0,064	M	--

12.9.1. Isolierung und analytische Daten von 6

Verbindung 6 wurde aus Fraktion SF I/3 in Form langer, blaßgelber Nadeln aus Diethylether auskristallisiert, die dc einheitlich waren.

Ausbeute: 31,5 mg = 0,027 % des Drogentrockengewichtes

Analytische Daten von 6 (Apigenin-7,4'-dimethylether)

MS, m/z (rel. Int.): 298 (M^+;100), 297 (M^+-H;11), 270 (M^+-CO; 6), 269 (M^+-HCO;17), 255 (M^+-COMe;13), 167 (A_1^++H;3), 166 (A_1^+;11), 138 (A_1^+-CO;13), 135 (B_2^+;18), 132 (B_1^+;17), 117 (B_1^+-Me;8), 95 (A_1^+-COMe-CO;11)

Summenformel: $C_{17}H_{14}O_5$ (MG: 298)

Schmp.: 168,6-170°C (nach [152]: 166-167°C)

UV, λ_{max}: s. Abb. 19, S. 40

IR, υ [cm^{-1}]: 3420 (OH), 2850 (Aryl-OCH_3), 1665 (α,β-ungesätt. C=O), 1605 (Aromat), 1510, 1440 (C=C, Aromat), 1250 (Aryl-O-Alkylether), 1190 (C-H, Aromat), 830 (Aromat, 1,4-Disubst.)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 7, S. 45

DC, R_f-Werte in den Systemen 6 und 9: 0,73 bzw. 0,95; bei 366 nm hellgelbe bis grüngelbe Fluoreszenz

12.9.2. Isolierung und analytische Daten von 7

Verbindung 7 fiel nach längerem Stehen im Kühlschrank unter Methanol aus Fraktion SF I/5 aus. Nach Umkristallisieren aus Methanol war sie, als grünlich-gelbes Pulver, dc rein.

Ausbeute: 4,2 mg

Analytische Daten von 7 (Genkwanin)

MS, m/z (rel. Int.): 284 (M^+;100), 283 (M^+-H;17), 256 (M^+-CO; 9), 255 (M^+-HCO;26), 241 (M^+-COMe;13), 167 (A_1^++H;14), 166 (A_1^+;12), 138 (A_1^+-CO;14), 123 (A_1^+-COMe;7), 121 (B_2^+;7), 118 (B_1^+;10), 95 (A_1^+-COMe-CO;18), 93 (B_2^+-CO;5), (vgl. [159])

Summenformel: $C_{16}H_{12}O_5$ (MG: 284)

Schmp.: 280-282°C (nach [162]: 282-284°C)

UV, λ_{max}: s. Abb. 25, S. 49

IR, υ [cm^{-1}]: 3400 (OH), 1660 (α,β-ungesättigtes C=O), 1600 (Aromat), 1585, 1500 (C=C, Aromat), 1195, 1180 (C-H, Aromat), 835 (Aromat, 1,4-Disubst.)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 8, S. 52

DC, R_f-Werte in den Systemen 6 und 9: 0,45 bzw. 0,56; grünlich-gelbe Fluoreszenz mit NA-Reagenz

12.9.3. Isolierung und analytische Daten von 8

Verbindung 8 wurde aus Fraktion SF I/2 in der Kälte aus Diethylether auskristallisiert. Nach mehrfachem Umkristallisieren aus Diethylether/Pentan (9:1) lag sie in Form larger, farbloser Nadeln dc einheitlich vor.

Ausbeute: 8,4 mg

Analytische Daten von 8 (Naringenin-7,4'-dimethylether)

MS, m/z (rel. Int.): 300 (M^+;74), 299 (M^+-H;35), 193 (M^+-(B-Ring);23), 167 (A_1^++H;30), 166 (A_1^+;3), 138 (A_1^+-CO;16), 134 (B_3^+;100), 121 (84), 119 (B_3^+-Me;29), 110 (10), 108 (M^+-(A- und C-Ring);10), 95 (A_1^+-COMe;22), 91 (26), (vgl. [169])

Summenformel: $C_{17}H_{16}O_5$ (MG: 300)

Schmp.: 114-115,5°C (nach [169]: 115,5-115,9°C)

UV, λ_{max}: s. Abb. 29, S. 55

IR, υ [cm^{-1}]: 3440 (OH), 2840 (Aryl-OMe), 1630 (chelat. C=O), 1580, 1520, 1460 (C=C, Aromat), 1250 (Aryl-O-Alkylether), 830 (Aromat, 1,4-Disubst.)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 9, S. 60

DC, R_f-Werte in den Systemen 2 und 6: 0,58 bzw. 0,77; gelbliche Fluoreszenz mit NA-Reagenz; Orangefärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz

12.9.4. Isolierung und analytische Daten von 9 und 10

Durch fraktionierte Kristallisation aus Methanol bei +5°C wurde die Hauptmenge von 11 und 12 als gelber Niederschlag erhalten. Im Filtrat lagen 9 und 10 neben Spuren von 11 und 12 vor (Rückstand 0,087 g). Der Filtratrückstand wurde sc aufgetrennt. Bedingungen und Ergebnisse der Trennung siehe Tabelle 28.

Zur Trennung von 9 und 10 wurde Fraktion SF II/2 in Methanol/Chloroform (1:1) gelöst und an selbstgestrichenen Kieselgel-Platten (Schichtdicke: 0,5 cm) im System 6 präparativ aufgetrennt (s. Kap. 12.4.2., S. 167). Nach mehrfachem Umkristallisieren aus Diethylether lag 9 in Form langer, farbloser Nadeln vor, während 10 als leicht gelbliche Kristallmasse gewonnen werden konnte.

Ausbeute: 9 insgesamt: 11,8 mg
10: 5,7 mg

Tab. 28: Ergebnisse der sc Trennung von 0,087 g Filtratrückstand von Fraktion SF I/4 an 3,5 g Kieselgel (70-230 mesh, Säulenlänge: 10 cm, Säulendurchmesser: 1 cm); Auffangvolumen: 2,5 ml

Fraktion	Menge [g]	Elutionsmittel	ident. Verb.
SF II/1	0,005	PE/E (8:2)	--
SF II/2	0,036	PE/E (8:2)	9,10
SF II/3	0,002	PE/E (8:2)	9
SF II/4	0,024	PE/E (7:3)	11,12
SF II/5	0,010	PE/E (1:1)	--
Rest	0,005	M	--

Analytische Daten von 9 (Persicogenin)

MS, m/z (rel. Int.): 316 (M^+;96), 315 (M^+-H;33), 193 (M^+-(B-Ring);29), 167 (A_1^++H;75), 166 (A_1^+;12), 150 (B_3^+;52), 138 (A_1^+-CO;18), 137 (A_1^+-HCO;100), 135 (B_3^+-Me;37), 124 (M^+-(A- und C-Ring);9), 123 (A_1^+-CO-Me;4), 117 (13), 95 (A_1^+-COMe-CO;13), (vgl. [170])

Summenformel: $C_{17}H_{16}O_6$ (MG: 316)

Schmp.: 160-161°C (nach [176]: 163-164°C)

UV, λ_{max}: s. Abb. 34, S. 63

IR, υ [cm^{-1}]: 3380 (OH), 2840 (Aryl-OMe), 1640 (chelat. C=O), 1565, 1530, 1510 (C=C, Aromat), 1255 (Aryl-O-Alkylether), 835 (Aromat, 1,3,4-Trisubst.)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 10, S. 65

DC, R_f-Werte in den Systemen 2 und 6: 0,58 bzw. 0,65; gelbliche Fluoreszenz mit NA-Reagenz; Orangefärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz

Analytische Daten von 10 (Sakuranetin)

MS, m/z (rel. Int.): 286 (M^+;88), 285 (M^+-H;40), 193 (M^+-(B-Ring);33), 180 (37), 167 (A_1^++H;100), 166 (A_1^+;32), 138 (18), 120 (B_3^+;41), 119 (12), 95 (A_1^+-COMe-CO;18), 91 (13)

Summenformel: $C_{16}H_{14}O_5$ (MG: 286)

Schmp.: 152-154°C (nach [180]: 155°C)

UV, λ_{max}: s. Abb. 38, S. 69

IR, υ [cm^{-1}]: 3400 (OH), 2850 (Aryl-OMe), 1640 (chelat. C=O), 1570, 1518, 1440 (C=C, Aromat), 835 (Aromat, 1,4-Disubst.)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 11, S. 72

DC, R_f-Werte in den Systemen 2 und 6: 0,58 bzw. 0,55; gelbliche Fluoreszenz mit NA-Reagenz; Orangefärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz

12.9.5. Isolierung und analytische Daten von 11 und 12

Ein Teil der aus Fraktion SF I/4 ausgefällten gelben Kristallmasse (0,109 g von insgesamt 0,264 g) wurde in Methanol gelöst und an selbstgestrichenen Kieselgelplatten (Schichtdicke: 0,5 cm) im System 6 präparativ getrennt. Nach Umkristallisieren aus CH_2Cl_2 lag 11 in blaßgelben Nadeln vor, während 12 aus Methanol als gelbe Kristallmasse gewonnen wurde.

Ausbeute: 11: 9,1 mg
12: 25,3 mg = 0,05 % des Drogentrockengewichtes

Analytische Daten von 11 (Luteolin-7,3',4'-trimethylether)

MS, m/z (rel. Int.): 328 (M^+;100), 327 (M^+-H;7), 300 (M^+-CO; 3), 299 (M^+-HCO;9), 285 (M^+-COMe;8), 167 (A_1^++H;19), 166 (A_1^+; 4), 165 (B_2^+;3), 162 (B_1^+;11), 150 (B_2^+-Me;14), 147 (B_1^+-Me; 8), 138 (A_1^+-CO;6), 95 (A_1^+-COMe-CO;11)

Summenformel: $C_{18}H_{16}O_6$ (MG: 328)

Schmp.: 162-163°C (nach [152]: 163°C)

UV, λ_{max}: s. Abb. 42, S. 74

IR, υ [cm^{-1}]: 3430 (OH), 2840 (Aryl-OMe), 1660 (α,β-ungesätt. C=O), 1610 (Aromat), 1515, 1500, 1440 (C=C, Aromat), 1255 (Aryl-O-Alkylether), 835 (Aromat, 1,3,4-Trisubst.)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 12, S. 78

DC, R_f-Werte in den Systemen 2, 6 und 9: 0,33, 0,73 bzw. 0,95; gelbe Fluoreszenz mit NA-Reagenz

Analytische Daten von 12 (Velutin)

MS, m/z (rel. Int.): 314 (M^+;100), 313 (M^+-H;10), 286 (M^+-CO; 6), 285 (M^+-HCO;18), 271 (M^+-COMe;13), 167 (A_1^++H;21), 166 (A_1^+;5), 151 (B_2^+;4), 148 (B_1^+;9), 138 (A_1^+-CO;8), 136 (B_2^+-Me;3), 133 (B_1^+-Me;10), 123 (B_2^+-CO;5), 95 (A_1^+-COMe-CO;9) (vgl. [159])

Summenformel: $C_{17}H_{14}O_6$ (MG: 314)

Schmp.: 222,5-224°C (nach [178]: 225°C)

UV, λ_{max}: s. Abb. 46, S. 80

IR, υ [cm^{-1}]: 3400 (OH), 2840 (Aryl-OMe), 1660 (α,β-ungesätt. C=O), 1605 (Aromat), 1500, 1430 (C=C, Aromat), 1260 (Aryl-O-Alkylether), 835 (Aromat, 1,3,4-Trisubst.)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 13, S. 83

DC, R_f-Werte in den Systemen 6 und 9: 0,56 bzw. 0,76; kräftige gelbe Fluoreszenz mit NA-Reagenz

12.9.6. Analytische Daten des Diacetats von 12

MS, m/z (rel. Int.): 398 (M^+;8), 356 (M^+-42;24), 314 (M^+-42-42; 100), 285 (11), 271 (7), 167 (14)

Summenformel: $C_{21}H_{18}O_8$ (MG: 398)

Schmp.: 206-207°C (nach [188]: 207°C)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 13, S. 83

12.9.7. Isolierung und analytische Daten von 13

Fraktion SF I/5 wurde in Methanol/Chloroform (1:1) gelöst und auf präparative DC-Platten (Kieselgel 60, Schichtdicke: 0,5 cm) aufgetragen. Nach Trennung im System 6 wurde 13 dc einheitlich erhalten. Trotz mehrerer Kristallisationsversuche aus verschiedenen Lösungsmitteln konnte es nicht kristallin erhalten werden.

Ausbeute: 1,9 mg

Analytische Daten von 13 (Cirsimaritin)

MS, m/z (rel. Int.): 314 (M^+;100), 313 (M^+-H;22), 299 (M^+-Me; 74), 296 (M^+-18;5), 285 (M^+-HCO;21), 271 (M^+-COMe;30), 181 (A_1^+-Me;19), 153 (A_1^+-COMe;43), 125 (A_1^+-COMe-CO;6), 121 (B_2^+; 7), 119 (18), 118 (B_1^+;8)

Summenformel: $C_{17}H_{14}O_6$ (MG: 314)

UV, λ_{max}: s. Abb. 50, S. 85

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 14, S. 88

DC, R_f-Werte in den Systemen 6 und 9: 0,39 bzw. 0,64; dunkle Substanzzone (keine Fluoreszenz) mit NA-Reagenz

12.10. Extraktion und Aufarbeitung der Blüten von A. viscosa

250 g getrocknete und gemahlene Blütenkörbchen wurden im Soxhletverfahren mit Petrolether (40-60°C)/Diethylether (1:2) unter DC-Kontrolle extrahiert und anschließend mit Methanol nachextrahiert. Der PE/E-Extrakt wurde nach Abzug des Lösungsmittels durch Digerieren mit Methanol (bei -17°C) von langkettigen, gesättigten Verbindungen befreit [241]. Nach Abnutschen und Entfernung des Lösungsmittels wurde das grüngelbe, ölige Filtrat über P_2O_5 getrocknet.
Rückstand: 16,38 g = 6,58 % der Droge

Der Methanolextrakt wurde eingeengt, mit Wasser versetzt, das organische Lösungsmittel weiter im Vakuum abgezogen, die verbleibende milchig-trübe Lösung mit Methylenchlorid extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des CH_2Cl_2 wurde der zähe, ockerfarbene Rückstand (3,46 g = 1,38 % der Droge) über P_2O_5 getrocknet.

12.10.1. Gewinnung der Sesquiterpenlacton- und Flavonoid-Fraktion

Die Fraktionierung der PE/E- und CH_2Cl_2-Extrakte erfolgte wie unter 12.7.1. (S. 171) beschrieben. Die Ergebnisse und Bedingungen der Trennungen, sowie die in den einzelnen Fraktio-

nen identifizierten Verbindungen sind den Tabellen 29 und 30 zu entnehmen.

Tab. 29: Ergebnis der sc Auftrennung von 16,38 g PE/E-Extrakt der Blüten von A. viscosa an Sephadex LH 20; Säulenlänge: 90 cm; Säulendurchmesser: 3,5 cm; Elutionsmittel: Methanol; Fraktionsvolumen: 30 ml

Fraktion	Menge [g]	ident. Verbindungen
B I	11,23	--
B II	3,98	1,2,4,5
B III	0,30	--
B IV	0,31	6-13
B V	0,02	14,15

Tab. 30: Ergebnis der sc Auftrennung von 3,46 g CH_2Cl_2-Blütenextrakt von A. viscosa (Bedingungen s. Tab. 29)

Fraktion	Menge [g]	ident. Verbindungen
BC I	1,42	--
BC II	1,53	1,2,4,5
BC III	0,21	--
BC IV	0,14	6-13
BC V	0,02	14,15

12.10.2. Fraktionierung der Sl-Fraktion

Die Fraktionen B II und BC II wurden vereinigt (5,51 g) und an Kieselgel sc aufgetrennt. Die Bedingungen und Ergebnisse sind den Tabellen 31 und 32 zu entnehmen.

Die in den Fraktionen B II/2/2, B II/2/4 und B II/2/5 anfallenden Sl wurden zur Identifizierung direkt einer DC-, GC- und GC/MS-Analyse zugeführt. Analytische Daten der identifizierten Verbindungen s. Kap. 12.8.1. bis 12.8.4.

Tab. 31: Ergebnis der sc Trennung von 5,2 g SI-Fraktion (B II und BC II) an 60 g Kieselgel 60 (70-230 mesh, Säulenlänge: 40 cm; Säulendurchmesser: 2,5 cm); Auffangvolumen: 10 ml

Fraktion	Menge [g]	Elutionsmittel	ident. Verb.
B II/1	3,27	i-Prop/H (77:23)	--
B II/2	0,38	i-Prop/H (77:23)	1,2,4,5
B II/3	1,24	i-Prop/M (1:1)	--

Tab. 32: Ergebnis der sc Auftrennung von 0,36 g der Fraktion B II/2 (s. Tab. 31) an 30 g Kieselgel 60 (70-230 mesh; Säulenlänge: 20 cm; Säulendurchmesser: 2,5 cm); Fraktionsvolumen: 5-7 ml

Fraktion	Menge [g]	Elutionsmittel	ident. Verb.
B II/2/1	0,086	PE/E (1:1-3:7)	--
B II/2/2	0,023	PE/E (3:7)	1,5
B II/2/3	0,013	PE/E (2:8-1:9)	--
B II/2/4	0,011	E	4
B II/2/5	0,012	E	2
Rest	0,198	E/i-Prop (1:1)	--

12.10.3. Fraktionierung der Fl-Fraktion

Die Fraktionen B IV und BC IV wurden vereinigt und wie unter 12.9. beschrieben aufgearbeitet. Dabei wurden 6-13 jeweils in solchen Mengen isoliert, daß eine UV-Analyse und DC-Vergleiche in mehreren Systemen durchgeführt werden konnten. Sie waren identisch mit den aus dem Kraut isolierten Fl 6-13. Analytische Daten der Verbindungen s. Kap. 12.9.1. bis 12.9.7.

12.10.4. Isolierung und analytische Daten von 14

Die Fraktionen B V und BC V enthielten mehrere Flavonoide (DC-Analyse), von denen jedoch nur 2 in einer höheren Konzentration vorlagen. Wegen der geringen Mengen wurden beide

Fraktionen vereinigt. Nach längerem Stehen unter Methanol bei +5°C fiel eine schmutzig-gelbe Substanz aus. Nach Umkristallisieren aus Methanol lag eine ockerfarbene Kristallmasse vor, die in mehreren DC-Systemen einheitlich war.

Ausbeute: 5 mg

Analytische Daten von 14 (Quercetin)

MS, m/z (rel.Int.): 302 (M^+;100), 301 (M^+-H;18), 284 (M^+-18; 2), 274 (M^+-CO;1), 273 (M^+-HCO;7), 272 (10), 245 (6), 228 (6), 227 (4), 153 (A_1^++H;10), 152 (A_1^+;2), 142 (5), 137 (B_2^+;15), 128 (7), 109 (B_2^+-CO;6)

Summenformel: $C_{15}H_{10}O_7$ (MG: 302)

Schmp.: 299-303°C (nach [242]: 309-312°C)

UV, λ_{max}: MeOH: 256, 275 sh, 295 sh, 372; NaOMe: 247, 335, 423 (instabil); $AlCl_3$: 272, 345 sh, 458; $AlCl_3$/HCl: 268, 308 sh, 363, 425; NaOAc: 275, 325, 395 (instabil); NaOAc/H_3BO_3 (Proc. II): 263, 295 sh, 388

^{1}H-NMR-Daten: (δ (ppm); 400 MHz, Lsm.: $CDCl_3$): 6.160 (d, J = 2Hz; H-6), 6.389 (d, J = 2 Hz; H-8), 6.868 (d, J = 8.5 Hz; H-5'), 7.519 (dd, J = 2 und 8.5 Hz; H-6'), 7.654 (d, J = 2 Hz; H-2')

DC, R_f-Wert im System 6: 0,06; orangefarbene Fluoreszenz mit NA-Reagenz

12.10.5. Isolierung und analytische Daten von 15

Der Filtratrückstand der vereinigten Fraktionen B V und BC V wurde zur Isolierung von 15 an Sephadex aufgetrennt. Die Ergebnisse und Bedingungen der Trennung sind der Tabelle 33 zu entnehmen.

Aus Fraktion B 5/2 wurde 15 in der Kälte aus Methanol als gelbe Kristallmasse gewonnen. Nach vorsichtigem Abpipettieren der überstehenden Lösung wurde die Substanz mit wenig Diethylether gewaschen und anschließend über Blaugel getrocknet.

Ausbeute: 2 mg

Tab. 33: Ergebnis der sc Auftrennung von 0,03 g Filtratrückstand der Fraktionen B V und BC V an 30 g Sephadex LH 20; Säulenlänge: 35 cm; Säulendurchmesser: 2,5 cm; Elutionsmittel: Methanol; Volumen der Fraktionen: 1-1,5 ml

Fraktion	Menge [g]	ident. Verbindungen
B 5/1	0,014	--
B 5/2	0,008	15
B 5/3	0,005	--

Analytische Daten von 15 (Kämpferol)

MS, m/z (rel. Int.): 286 (M^+;100), 285 (M^+-H;22), 258 (M^+-CO; 17), 257 (M^+-HCO;17), 229 (18), 213 (10), 184 (7), 153 (A_1^++H; 11), 152 (A_1^+;2), 138 (5), 136 (10), 121 (B_2^+;20), 108 (9), 105 (10), 93 (B_2^+-CO;16)

Summenformel: $C_{15}H_{10}O_6$ (MG: 286)

UV, λ_{max}: MeOH: 245 sh, 255 sh, 267, 295 sh, 320, 367; NaOMe: 277, 320, 410 (nicht stabil); $AlCl_3$: 230 sh, 245 sh, 272, 308 sh, 352, 425; $AlCl_3$/HCl: 230 sh, 245 sh, 270, 308 sh, 349, 425; NaOAc: 275, 308, 382; NaOAc/H_3BO_3 (Proc. II): 267, 295 sh, 320 sh, 367

^{1}H-NMR-Daten: (δ (ppm); 400 MHz, Lsm.: DMSO-d_6): 6.113 (d, J = 2 Hz; H-6), 6.36 (d, J = 2 Hz; H-8), 6.663 (s(br),OH), 6.9 (d, J = 9.5 Hz; H-3'/H-5'), 8.016 (d, J = 9.5 Hz; H-2'/H-6')

DC, R_f-Wert im System 6: 0,16; gelbgrüne Fluoreszenz mit NA-Reagenz

12.11. Gehaltsbestimmung des ätherischen Öles der Rhizome, Blätter und Blüten von Arnica viscosa

Jeweils 10 g getrocknete und pulverisierte Rhizome, Blätter und Blütenkörbchen wurden an der "Karlsruher Apparatur" einer 4-stündigen Wasserdampfdestillation unterworfen. Das ätheri-

sche Öl wurde in einer n-Pentan-Vorlage aufgenommen, nach Abdampfen des Pentans über Blaugel getrocknet und gravimetrisch bestimmt. Es wurden jeweils drei Parallelanalysen durchgeführt und für die Gehaltsangaben gemittelt.

12.12. Inhaltsstoffe der ätherischen Öle von A. viscosa

12.12.1. Identifizierung und analytische Daten von 16-22

Die Verbindungen 16-22 wurden durch DC-, GC- und GC/MS-Analyse der ätherischen Öle im direkten Vergleich mit authentischen Verbindungen (Darstellung s. Kap. 12.5.) identifiziert. Bei 16 handelt es sich um einen Sesquiterpenkohlenwasserstoff, dessen Struktur nicht ermittelt werden konnte.

Analytische Daten von 16

MS, m/z (rel. Int.): 204 (M^+;100), 189 (58), 175 (19), 161 (45), 147 (13), 133 (18), 119 (56), 107 (20), 105 (37), 93 (23) 91 (29), 79 (14), 69 (11), 55 (20), 41 (35)

Summenformel: $C_{15}H_{24}$ (MG: 204)

GC, RT: s. Tab. 34

Analytische Daten von 17 (Thymol)

MS, m/z (rel. Int.): 150 (M^+;30), 135 (100), 117 (9), 115 (12), 91 (16), 77 (8)

Summenformel: $C_{10}H_{14}O$ (MG: 150)

DC, R_f-Wert im System 11: s. Tab. 34; Orangefärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz; Rotfärbung mit Vanillin/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT: s. Tab. 34

Analytische Daten von 18 (Thymolmethylether)

MS, m/z (rel. Int.): 164 (M^+;35), 149 (100), 135 (3), 134 (8), 119 (20), 91 (14)

Summenformel: $C_{11}H_{16}O$ (MG: 164)

DC, R_f-Wert im System 11: s. Tab. 34; Rotfärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz; rotviolette Färbung mit Vanillin/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT: s. Tab. 34

Analytische Daten von 19 (Thymolisobuttersäureester)

MS, m/z (rel. Int.): 220(M^+;14), 150 (88), 135 (100), 115 (7), 91 (12), 71 (33), 43 (98)

Summenformel: $C_{14}H_{20}O_2$ (MG: 220)

DC, R_f-Wert im System 11: s. Tab. 34; Orangefärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz; Rotfärbung mit Vanillin/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT: s. Tab. 34

Tab. 34: R_f- und RT-Werte der im ätherischen Öl von A. viscosa identifizierten Verbindungen und deren prozentualer Anteil am Gesamtöl (DC-System 11 und GC-System 2, 3 und 5)

Verbindungen	%	RT			R_f
		Syst. 2	Syst. 3	Syst. 5	
Rhizomöl					
Verbindung 16	2	4,9	10,7	6,2	-
Thymol (17)	4	2,75	28,85	3,45	0,24
Thymolmethylether (18)	1	2,0	12,8	2,7	0,97
Thymol-isobut. (19)	36	6,5	22,1	8,0	0,66
6-Hydroxy-dimethyl-thymylether (20)	50	5,2	21,2	6,4	0,83
Thymol-2-methylbut. (21)	~1	8,8	23,9	10,55	0,68
Thymol-isoval. (22)	~3	8,8	24,2	10,55	0,68
Caryophyllenoxid (23)	<0,5	n.b.	23,7	n.b.	0,34
Blattöl					
Verbindung 25	23	6,7	25,3	n.b.	0,17
T-Muurolol (24)	48	8,2	29,1	n.b.	0,13

Analytische Daten von 20 (6-Hydroxy-dimethyl-thymylether)

MS, m/z (rel. Int.): 194 (M^+;99), 179 (100), 164 (52), 149 (17), 135 (6), 134 (7), 119 (20), 105 (8), 91 (25), 77 (13)

Summenformel: $C_{12}H_{20}O_2$ (MG: 194)

DC, R_f-Wert im System 11: s. Tab. 34; Gelbfärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz; Gelbfärbung mit Vanillin-H_2SO_4-Reagenz

GC, RT: s. Tab. 34

Analytische Daten von 21 (Thymol-2-methylbuttersäureester)

MS, m/z (rel. Int.): 234 (M^+;4), 150 (42), 135 (51), 115 (4), 105 (5), 91 (9), 85 (18), 57 (100)

Summenformel: $C_{15}H_{22}O_2$ (MG: 234)

DC, R_f-Wert im System 11: s. Tab. 34; Orangefärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz; Rotfärbung mit Vanillin/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT: s. Tab. 34

Analytische Daten von 22 (Thymolisovaleriansäureester)

MS, m/z (rel. Int.): 234 (M^+;8), 150 (83), 135 (100), 115 (6), 105 (7), 91 (8), 85 (13), 57 (41)

Summenformel: $C_{15}H_{22}O_2$ (MG: 234)

DC, R_f-Wert im System 11: s. Tab. 34; Orangefärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz; Rotfärbung mit Vanillin/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT: s. Tab. 34

12.12.2. Isolierung und analytische Daten von 23

Verbindung 23 war dc in allen drei Ölen nachweisbar. Ihre Isolierung erfolgte aus dem Rhizomöl durch präparative DC an selbstgestrichenen Kieselgelplatten im System 11. Als Marker diente Thymol, das im UV-Licht wenig unterhalb von 23 sichtbar war. Nach vorsichtigem Auskratzen der relativ breit gewählten Substanzzone wurde das Kieselgel mit Diethylether extrahiert und das Lösungsmittel vorsichtig abdestilliert. Die-

se Fraktion, die neben Thymol nur noch 23 in stärkerer Konzentration enthielt, wurde einer GC- und GC/MS-Analyse zugeführt und die Identität mit Caryophyllenoxid im direkten DC- und GC-Vergleich mit der Vergleichssubstanz ermittelt.

Analytische Daten von 23 (Caryophyllenoxid)

MS, m/z (rel. Int.): 220 (M^+;2), 205 (4), 177 (8), 161 (7), 149 (11), 138 (22), 123 (26), 121 (37), 110 (37), 109 (50), 106 (4), 95 (67), 93 (80), 91 (58), 81 (49), 79 (98), 69 (75), 67 (47), 55 (48), 43 (100), 41 (94)

Summenformel: $C_{15}H_{24}O$ (MG: 220)

DC, R_f-Wert im System 11: s. Tab. 34; rotviolette Färbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4- und Vanillin/H_2SO_4-Reagenz

GC, RI: s. Tab. 34

12.12.3. Identifizierung von 24 und 25

Die beiden Hauptkomponenten des ätherischen Öles der Blätter wurden im Öl durch GC- und GC/MS-Analyse charakterisiert. Verbindung 24 war hierbei im direkten Vergleich identisch mit T-Muurolol.

Beide Verbindungen sind aufgrund der GC- und GC/MS-Analysen auch Inhaltsstoffe des ätherischen Öles der Blüten.

Analytische Daten von 24 (T-Muurolol)

MS, m/z (rel. Int.): 222 (M^+;4); 204 (M^+-18;21), 189 (4), 179 (4), 164 (26), 161 (39), 121 (58), 119 (18), 109 (31), 105 (35), 95 (95), 81 (37), 79 (41), 71 (58), 69 (41), 67 (17), 58 (40), 55 (38), 43 (100), 41 (75)

Summenformel: $C_{15}H_{26}O$ (MG: 222)

DC, R_f-Wert im System 11: s. Tab. 34; rotviolette Färbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz; blauviolette Färbung mit Vanillin/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT: s. Tab. 34

Analytische Daten von 25

MS, m/z (rel. Int.): 204 (M^+;3), 189 (4), 161 (28), 136 (45), 123 (28), 121 (28), 119 (20), 109 (32), 107 (71), 95 (30), 93 (97), 81 (78), 79 (54), 71 (94), 69 (100), 67 (68), 55 (86), 43 (98), 41 (100)

Summenformel: $C_{15}H_{24}$ (MG: 204)

DC, R_f-Wert im System 11: s. Tab. 34; rotviolette Färbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4- und Vanillin/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT: s. Tab. 34

12.13. Extraktion und Aufarbeitung der Blätter von Arnica nevadensis

296 g getrocknete und gemahlene Blätter von A. nevadensis wurden in gleicher Weise extrahiert und aufgearbeitet, wie unter 12.10. beschrieben.

PE/E (1:2): Rückstand: 11,31 g = 3,82 % des Drogentrockengew.
CH_2Cl_2 : " : 4,67 g = 1,57 % " "

12.13.1. Gewinnung der Sesquiterpenlacton- und Flavonoid-Fraktion

Die Fraktionierung der beiden Extrakte erfolgte wie unter 12.7.1. beschrieben an Sephadex LH 20. Die Ergebnisse und Bedingungen der Trennungen sind den Tabellen 35 und 36 zu entnehmen.

Tab. 35: Ergebnis der sc Trennungen von 11,3 g Rohextrakt (PE/E) von A. nevadensis an Sephadex LH 20; Säulenlänge: 90 cm; Säulendurchmesser: 3,5 cm; Elutionsmittel: Methanol; Volumen der Fraktionen: 30 ml

Fraktion	Menge [g]	ident. Verbindungen
N I	4,06	--
N II	5,96	26-29
N III	0,17	--
N IV	0,14	13,30,31
N V	0,230	32,33
N VI	0,08	35.36
N VII	0,03	14,15

Tab. 36: Ergebnis der sc Fraktionierung von 4,6 g CH_2Cl_2-Extrakt an Sephadex LH 20 (Chrom. Daten s. Tab. 35)

Fraktion	Menge [g]	ident. Verbindungen
NC I	2,063	--
NC II	2,126	26-29
NC III	0,120	--
NC IV	0,017	13,30,31
NC V	0,057	32,33
NC VI	0,014	34
NC VII	0,018	35,36
NC VIII	0,015	14,15

12.14. Fraktionierung der SI-Fraktionen

Bei den DC-Analysen wurde festgestellt, daß in den Fraktionen N II und NC II die Verbindungen 26-29 in z.T. deutlich unterschiedlichen Konzentrationen vorlagen. Deshalb wurden beide Extrakte getrennt sc aufgearbeitet. Die Bedingungen und Ergebnisse der Trennungen sowie die in den einzelnen Teilfraktionen identifizierten Sesquiterpenlactone sind den Tabellen 37 und 38 zu entnehmen.

Tab. 37: Ergebnis der sc Trennung von 5,9 g der Fraktion N II an 240 g Kieselgel (70-230 mesh; Säulenlänge: 70 cm; Säulendurchmesser: 3,5 cm); Fraktionsvolumen: 10 ml

Fraktion	Menge [g]	Elutionsmittel	ident. Verb.
N II/1	1,59	PE/E (9:1-8:2)	--
N II/2	0,27	PE/E (8:2)	27
N II/3	0,38	PE/E (8:2-2:8)	--
N II/4	0,02	PE/E (2:8)	26,28
N II/5	0,56	PE/E (2:8-1:9)	26
N II/6	0,12	E	26,29
N II/7	0,67	E/i-Prop (8:2-1:1)	--
Rest	1,84	i-Prop/M (1:1)	--

Tab. 38: Ergebnis der sc Trennung von 2,1 g der Fraktion NC II an 130 g Kieselgel (70-230 mesh; Säulenlänge: 75 cm; Säulendurchmesser: 2,5 cm); Fraktionsvolumen: 10 ml

Fraktion	Menge [g]	Elutionsmittel	ident. Verb.
NC II/1	0,654	PE/E (9:1-7:3)	--
NC II/2	0,010	PE/E (7:3-6:4)	27
NC II/3	0,368	PE/E (6:4-3:7)	--
NC II/4	0,012	PE/E (3:7-1:9)	26,28
NC II/5	0,209	PE/E (1:9)	26
NC II/6	0,023	E	26,29
NC II/7	0,125	E/i-Prop (8:2-1:1)	--
Rest	0,622	i-Prop/M (1:1)	--

12.14.1. Isolierung und analytische Daten von 26

Verbindung 26 wurde aus den Teilfraktionen N II/5 und NC II/5 nach Zugabe von Diethylether auskristallisiert. Nach mehrfachem Umkristallisieren aus Diethylether lag die Substanz in Form weißer Kristalle vor, die gc und dc einheitlich waren.

Ausbeute: 132 mg = 0,045 % des Drogentrockengewichtes

Analytische Daten von 26 (Ivalin)

CH-Analyse: Gef.: C 72,83; H 8,2 ; O 18,97
Ber.: C 72,65; H 8,13; O 19,22

MS, m/z (rel. Int.): 248 (M^+;3), 230 (M^+-18;41), 215 (M^+-18-15;17), 197 (9), 189 (10), 185 (28), 169 (19), 157 (14), 145 (20), 143 (29), 134 (24), 133 (25), 132 (24), 120 (15), 119 (100), 117 (22), 105 (43), 95 (14), 93 (37), 91 (55), 79 (29), 77 (24), 68 (19), 55 (19), 43 (14)

Summenformel: $C_{15}H_{20}O_3$ (MG: 248)

Schmp.: 128-130,5°C (nach [212]: 130-132°C)

UV, λ_{max}: 209 nm

IR, υ [cm^{-1}]: 3440, 3390 (OH), 3090 (C-H, Exomethylengr.), 1765 , 1725 (C=O, ungesätt. γ-Lacton), 1665 (C=C, Exomethylengr.), 1645 (C=C), 820 (C-H, Exomethylengr.)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 15, S. 107

^{13}C-NMR-Daten: s. Tab. 16, S. 110

DC, R_f-Werte in den Systemen 2 und 3: 0,16 bzw. 0,34; negative Zimmermann-Reaktion; rotviolette Färbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT im System 1: 9,6 Min.

12.14.2. Isolierung und analytische Daten von 27

Verbindung 27 wurde durch vorsichtiges Zutropfen von Pentan zur etherischen Lösung aus Fraktion N II/2 bei +5°C auskristallisiert. Nach Umkristallisieren aus Diethylether lag sie rein weiß, kristallin und gc und dc einheitlich vor.

Ausbeute: 29,4 mg = 0,01 % des Drogentrockengewichtes

Analytische Daten von 27 (2-O-Acetyl-ivalin)

CH-Analyse: Gef.: C 70,041; H 7,037; O 22,32
Ber.: C 70,40 ; H 7,646; O 21,95

MS, m/z (rel. Int.): 230 (M^+-CH_3COOH;96), 215 (17), 197 (17), 185 (23), 169 (21), 157 (19), 145 (18), 143 (39), 134 (15), 133 (14), 132 (20), 120 (32), 119 (100), 117 (18), 106 (27), 105 (43), 95 (18), 93 (31), 91 (47), 77 (21), 68 (10), 55 (15), 43 (97) (vgl. [111])

Summenformel: $C_{17}H_{22}O_4$ (MG: 290)

Schmp.: 147-148,5°C (nach [210]: 148,5-150°C)

UV, λ_{max}: 210 nm

IR, υ [cm^{-1}]: 3080 (C-H, Exomethylengr.), 1765 (C=O, γ-Lacton), 1735 (C=O, Ester), 1665 (C=C, Exomethylengr.), 1648 (C=C), 1232 (C-C, Ester), 815 (C-H, Exomethylengr.)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 17, S. 115

DC, R_f-Werte in den Systemen 2 und 3: 0,67 bzw. 0,93; negative Zimmermann-Reaktion; rotviolette Färbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT im System 1: 10,8 Min.

12.14.3. Isolierung und analytische Daten von 28

Verbindung 28 wurde nach Vereinigung der Fraktionen N II/4 und NC II/4 zur Fraktion N 8 über eine Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie-Säule gereinigt. Die Ergebnisse und Bedingungen der Trennung sind Tabelle 39 zu entnehmen.

Tab. 39: Ergebnis der sc Trennung von 0,03 g der Fraktion N 8 an 5 g LiChroprep Si 60 (Säulenlänge: 50 cm; Säulendurchmesser: 1 cm); Auffangvolumen: 100 Tropfen/Glas (ca. 10 ml)

Fraktion	Menge [g]	Elutionsmittel	ident. Verb.
N 8/1	0,012	PE/E (2:8)	--
N 8/2	0,010	PE/E (2:8)	28, Spuren 26
N 8/3	0,005	PE/E (2:8)-E	26

Hierbei wurde 28 weitgehend von 26 getrennt. Zur weiteren Reinisolierung wurde die Fraktion N 8/2 in 1 ml Methanol ge-

löst und durch HPLC im System 2 präparativ aufgetrennt. Aufgabemenge pro Durchlauf: 100 µl
Retentionszeiten: 28: 6,1 Min.
26: 7,1 Min.

Ausbeute: 2,4 mg weiße Kristalle

Analytische Daten von 28 (Asperilin)

MS, m/z (rel. Int.): 248 (M^+;6), 230 (71), 215 (14), 205 (14), 204 (20), 202 (11), 189 (25), 185 (19), 179 (18), 175 (25), 159 (33), 158 (20), 143 (25), 133 (19), 120 (22), 119 (91), 118 (12), 117 (33), 108 (23), 107 (30), 106 (32), 105 (42), 95 (29), 93 (100), 91 (73), 79 (60), 67 (35), 65 (24), 55 (43), 53 (57), 43 (44), 41 (68)

Summenformel: $C_{15}H_{20}O_3$ (MG: 248)

UV, λ_{max}: 210 nm

IR, υ [cm^{-1}]: 3460 (OH), 3080 (C-H, Exomethylengr.), 1756 (C=O, γ-Lacton), 1665 (C=C, Exomethylengr.), 1645 (C=C, Exomethylengr.), 820 (C-H, Exomethylengr.)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 18, S. 121

DC, R_f-Werte in den Systemen 2 und 3: 0,18 bzw. 0,42; negative Zimmermann-Reaktion; Blaufärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT im System 1: 9,75 Min.

12.14.4. Isolierung und analytische Daten von 29

Verbindung 29 lag in Fraktion NC II/6 in größerer Konzentration vor als in der Fraktion N II/5, so daß ihre Isolierung aus dieser Fraktion erfolgte. Eine Isolierung durch HPLC-Trennung war nicht möglich, weil die Substanz mit dem verwendeten UV-Detektor nicht detektierbar war. Das Ergebnis der sc Trennung an Kieselgel ist der Tabelle 40 zu entnehmen.

Verbindung 29 lag nach vorsichtigem Waschen der Teilfraktion NC II/6/4 mit kaltem Pentan/Diethylether (1:1) gc rein vor.

Ausbeute: 1,5 mg

Tab. 40: Sc Auftrennung von 0,02 g der Fraktion NC II/6 an Kieselgel (230-400 mesh; Säulenlänge: 8 cm; Säulendurchmesser: 1 cm); Auffangvolumen: 1 ml

Fraktion	Menge [g]	Elutionsmittel	ident. Verb.
NC II/6/1	0,002	E/P (9:1)	--
NC II/6/2	0,003	E/P (9:1)	26
NC II/6/3	0,007	E/P (9:1)	26,29
NC II/6/4	0,002	E/P (9:1)	29
NC II/6/5	0,003	E-M	--

Analytische Daten von 29 (11α,13-Dihydroivalin)

MS, m/z (rel. Int.): 250 (M^+;3), 232 (42), 217 (18), 160 (13), 159 (94), 158 (75), 144 (11), 143 (76), 131 (19), 120 (18), 119 (100), 118 (7), 108 (9), 107 (64), 106 (23), 105 (26), 95 (73), 93 (35), 91 (38), 79 (35), 77 (27), 74 (28), 67 (24), 55 (35), 43 (17), 41 (58)

Summenformel: $C_{15}H_{22}O_3$ (MG: 250)

UV, λ_{max}: keine Absorption

IR, υ [cm^{-1}]: 3420 (OH), 3080 (C-H, Exomethylengr.), 1768 (C=O, γ-Lacton), 1645 (C=C), 815 (C-H, Exomethylengr.)

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 19, S. 126

DC, R_f-Werte in den Systemen 2 und 3: 0,12 bzw. 0,27; negative Zimmermann-Reaktion; rotviolette Färbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz

GC, RT im System 1: 9,5 Min.

12.15. Isolierung von 13,30 und 31

Die vereinigten Fraktionen N IV und NC IV (0,157 g) wurden durch präparative DC an Kieselgel 60-Fertigplatten im System 6 (Kammer ohne Filterpapier) aufgetrennt. Nach Umkristallisieren aus Methanol lagen 13 und 30 dc rein vor, während 31 nur im Gemisch mit 30 isoliert werden konnte.

Ausbeute: 13 : 3,7 mg
30 : 4,5 mg
30/31: 2,4 mg

12.15.1. Analytische Daten von 30 (Pectolinarigenin)

MS, m/z (rel. Int.): 314 (M^+;100), 313 (M^+-H;7), 299 (M^+-Me; 58), 297 (M^+-17;12), 296 (M^+-18;52), 286 (M^+-CO;2), 285 (M^+-HCO;8), 271 (M^+-Me-CO;45), 268 (12), 167 (A_1^+-Me;12), 157 (7), 153 (A_1^+-HCO;7), 139 (15), 135 (B_2^+;8), 133 (25), 132 (B_1^+;8), 120 (B_2^+-Me;2), 117 (B_1^+-Me;5), 111 (A_1^+-COMe-CO;2) (vgl. [139])

Summenformel: $C_{17}H_{14}O_6$ (MG: 314)

UV, λ_{max}: s. Abb. 78, S. 129

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 20, S. 132

DC, R_f-Werte in den Systemen 6 und 9: 0,56 bzw. 0,74; keine Fluoreszenz mit Naturstoffreagenz

12.15.2. Analytische Daten von 31 (5,6,7,3',4'-pentasubstituiertes Flavon)

MS, m/z (rel. Int.): 344 (M^+;100), 329 (M^+-Me;9), 301 (M^+-Me-CO;36)

Summenformel: $C_{18}H_{16}O_7$ (MG: 344)

^{1}H-NMR-Daten: (δ (ppm); 360 MHz, Lsm.: $CDCl_3$): 3.958 (s; CH_3O-), 4.003 (s; CH_3O-), 6.603 (s; H-3), 6.628 (s; H-8), 7.078 (d, J = 8.5 Hz; H-5'), 7.367 (d, J = 2 Hz; H-2'), 7.537 (dd, J = 2/8.5 Hz; H-6')

DC, R_f-Werte in den Systemen 6 und 9: 0,54 bzw. 0,72; keine Fluoreszenz mit NA-Reagenz

12.16. Isolierung von 32 und 33

Beide Verbindungen kristallisierten aus den vereinigten Fraktionen N V und NC V aus Methanol bei +5°C aus. Die gelbe Kristallmasse (0,026 g) wurde in Methanol gelöst und über präparative DC an Kieselgel 60-Fertigplatten im System 6 (ohne

Filterpapierauskleidung) getrennt. Nach üblicher Aufarbeitung (s. Kap. 12.4.2.) und Umkristallisation aus Methanol lag 32 als gelbe und 33 als leicht ockerfarbene Kristallmasse vor.

Ausbeute: 32: 7,7 mg = 0,003 % des Drogentrockengewichtes
33: 4,0 mg

12.16.1. Analytische Daten von 32 (Hispidulin)

MS, m/z (rel. Int.): 300 (M^+;100), 299 (M^+-H;10), 285 (M^+-Me; 67), 282 (M^+-18;47), 272 (M^+-CO;4), 271 (M^+-HCO;11), 257 (M^+-COMe;59), 167 (A_1^+-Me;22), 153 (A_1^+-HCO;12), 139 (A_1^+-MeCO;28), 121 (B_2^+;13), 119 (30), 118 (B_1^+;19), 111 (A_1^+-MeCO-CO;4), 93 (B_2^+-CO;4)

Summenformel: $C_{16}H_{12}O_6$ (MG: 300)

Schmp.: 285-290°C (nach [243]: 289-290°C)

UV, λ_{max}: s. Abb. 81, S. 135

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 21, S. 138

DC, R_f-Werte in den Systemen 6 und 9: 0,27 bzw. 0,33; keine Fluoreszenz mit NA-Reagenz

12.16.2. Analytische Daten von 33 (Jaceosidin)

MS, m/z (rel. Int.): 330 (M^+;100), 329 (M^+-H;7), 315 (M^+-Me; 62), 313 (M^+-17;14), 312 (M^+-18;57), 302 (M^+-CO;2), 301 (M^+-HCO;6), 287 (M^+-COMe;39), 284 (13), 183 (4), 167 (A_1^+-Me;12), 165 (5), 153 (A_1^+-HCO;6), 151 (B_2^+;5), 149 (16), 148 (B_1^+;5), 139 (A_1^+-MeCO;15), 136 (B_2^+-Me;6), 123 (B_2^+-CO;2), 117 (5)

Summenformel: $C_{17}H_{14}O_7$ (MG: 330)

UV, λ_{max}: s. Abb. 84, S. 139

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 22, S. 141

DC, R_f-Werte in den Systemen 6 und 9: 0,36 bzw. 0,42; keine Fluoreszenz mit NA-Reagenz

12.17. Nachweis von 34 (Eupafolin)

Das in Fraktion NC VI auftretende Flavonoid 34 zeigte beim direkten DC-Vergleich mit Patuletin (6-OMe-Quercetin) und Eupafolin (6-OMe-Luteolin) keinen Unterschied im Lauf- und Detektionsverhalten gegenüber Eupafolin.

DC, R_f-Werte in den Systemen 6,9,10: 0,11, 0,18 bzw. 0,14

12.18. Isolierung von 35 und 36

Beide Verbindungen wurden aus den Fraktionen N VI und NC VII durch präparative DC an Kieselgel 60-Fertigplatten im System 7 isoliert. 35 wurde aus Methanol als gelbe Kristallmasse auskristallisiert. Eine Kristallisation von 36 war wegen der geringen Menge nicht möglich.

Ausbeute: 35: 8,6 mg = 0,003 % des Drogentrockengewichtes
36: 1,5 mg

12.18.1. Analytische Daten von 35 (6-OMe-Kämpferol)

MS, m/z (rel. Int.): 316 (M^+;100), 315 (M^+-1;9), 301 (M^+-15; 16), 299 (M^+-17;9), 298 (M^+-18;36), 287 (M^+-HCO;2), 273 (M^+-COMe;97), 270 (13), 167 (A_1^+-Me;4), 158 (10), 147 (9), 134 (4), 121 (B_2^+;28), 118 (B_1^+;3), 107 (6), 105 (6), 93 (B_2^+-CO;9)

Summenformel: $C_{16}H_{12}O_7$ (MG: 316)

Schmp.: 265-268°C (nach [244]: ~270°C)

UV, λ_{max}: s. Abb. 87, S. 145

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 23, S. 148

DC, R_f-Werte in den Systemen 6 und 9: 0,27 bzw. 0,21; gelbgrüne Fluoreszenz mit NA-Reagenz

12.18.2. Analytische Daten von 36 (Spinacetin)

UV, λ_{max}: s. Abb. 90, S. 149

^{1}H-NMR-Daten: s. Tab. 24, S. 150

DC, R_f-Werte in den Systemen 6 und 9: 0,35 bzw. 0,21; gelbliche bis gelbgrüne Fluoreszenz mit NA-Reagenz

13. LITERATURVERZEICHNIS

1. WILLUHN, G.: Neue Ergebnisse der Arnikaforschung; Pharm. Unserer Zeit 10, 1-7 (1981)
2. JARUZELSKI, M., Z. KOWALEWSKI, I. MATLAWSKA und L. SKRZYPCZAKOWA: Composition of the Inflorescence of some Species of Arnica. Part III. Essential Oil and Phenolic Compounds in the Raw Material from Experimental Plantations; Diss. Pharm. Pharmacol. 22, 25-33 (1970)
3. SEIDEL, F. und H. KATING: Anbauversuche mit Arnica-Arten. I. Generative Vermehrung von Arnica montana L.; Planta Med. 15, 293-305 (1967)
4. KATING, H. und F. SEIDEL: Anbauversuche mit Arnica-Arten. II. Vegetative Vermehrung von Arnica montana L.; Planta Med. 15, 420-29 (1967)
5. SCHILCHER, H.: Probleme bei der Beschaffung von Drogen mit Arzneibuchqualität; Pharm. Ztg. 126, 2119-28 (1981)
6. WOODWARD, E.F.: Botanical Drugs - A Brief Review of the Industry with Comments on Recent Developments; Econ. Bot. 1, 402-14 (1947)
7. KATING, H., W. RINN und F. SEIDEL: Das ätherische Öl von Arnica chamissonis Less. mit einer Beschreibung der kultivierten Unterarten und Varietäten; Abhandlungen der Marburger Gelehrten Gesellschaft, Jg. 1971, Nr. 4, S. 151-258, Wilhelm Fink Verlag, München, 1973
8. BRUNZELL, A. und S. WESTER: Vergleiche zwischen Arnica chamissonis und Arnica montana (schwed.); Sven. Farm. Tidskr. 51, 645-51 und 693-703 (1947)
9. LUCKNER, M., O. BESSLER und R. LUCKNER: Vorschläge für den Drogenteil des DAB 7. 14. Mitteilung: Flores Arnicae; Pharmazie 20, 681-82 (1965)
10. WILLUHN, G., J. KRESKEN und I. MERFORT: Arnikablüten: Identitäts- und Reinheitsprüfung. Dünnschichtchromatographie der Sesquiterpenlactone und Flavonoide; Dtsch. Apoth. Ztg. 123, 2431-34 (1983)

11. TSCHIRCH, A.: Handbuch der Pharmakognosie; Bd. 2, S. 1174-84, Verlag Chr. Hermann Tauchnitz, Leipzig, 1917

12. MAGUIRE, B.: A Monograph of the Genus Arnica; Brittonia 4, 386-510 (1943)

13. BENTHAM, G.: Notes on the Classification, History and Geographical Distribution of the Compositae; J. Linn. Soc. London Bot. 13, 335-557 (1873)

14. HOFFMANN, O.: Compositae; in A. ENGLER und K. PRANTL (Hrsg.): Die natürlichen Pflanzenfamilien; Bd. 4, S. 87-391, Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1894

15. NORDENSTAM, B.: Senecioneae and Liabeae - Systematic Review; in V.H. HEYWOOD, J.B. HARBORNE und B.L. TURNER (Hrsg.): The Biology and Chemistry of the Compositae; Bd. 1/2, S. 799-830, Academic Press, New York, 1977

16. HEGNAUER, R.: The Chemistry of the Compositae; in V.H. HEYWOOD, J.B. HARBORNE und B.L. TURNER (Hrsg.): The Biology and Chemistry of the Compositae; Bd. 1/2, S. 283-335, Academic Press, New York, 1977

17. BOHLMANN, F. und C. ZDERO: Neue Thymolderivate aus Arnica amplexicaulis; Tetrahedron Lett., 2827-28 (1972)

18. HEROUT, V.: Chemotaxonomy of the Family Compositae (Asteraceae); in H. WAGNER und L. HÖRHAMMER (Hrsg.): Pharmacognosy and Phytochemistry; S. 93-110, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, 1971

19. REYNOLDS, G.W. und E. RODRIGUEZ: Mexicanin I, a Helenanolide Sesquiterpene Lactone in Hulsea and its Systematic Implication; Biochem. Syst. Ecol. 9, 297-98 (1981)

20. ROBINSON, H.: A Revision of the Tribal and Subtribal Limits of the Heliantheae (Asteraceae); Smithsonian Contributions to Botany, Nr. 51, Smithsonian Institution Press, Washington, 1981

21. TURNER, B.L. und A.M. POWELL: Helenieae - Systemative Review; in V.H. HEYWOOD, J.B. HARBORNE und B.L. TURNER (Hrsg.): The Biology and Chemistry of the Compositae; Bd. 1/2, S. 699-737, Academic Press, New York

22. SEAMAN, F.C.: Sesquiterpene Lactones as Taxonomic Characters in the Asteraceae; Bot. Rev. 48, 121-595 (1982)

23. STRAYLEY, G.B.: Systematica of Arnica, Subgenus Austromontana and a new Subgenus Calarnica (Asteraceae: Senecioneae); Ph. D. Dissertation, University of British Columbia, 1980 (zitiert nach [24])

24. WOLF, S.J. und K.E. DENFORD: Taxonomy of Arnica (Compositae) Subgenus Austromontana; Rhodora, 86, 239-309 (1984)

25. WOLF, S.J., K.E. DENFORD: Flavonoid Diversity and Endemism in Arnica Subgenus Austromontana; Biochem. Syst. Ecol. 12, 183-88 (1984)

26. WOLF, S.J.: Cytogeographical Studies in the Genus Arnica (Compositae: Senecioneae) I.; Amer. J. Bot. 300-08 (1980)

27. FISCHER, N.H., E.J. OLIVIER und H.D. FISCHER: The Biogenesis and Chemistry of Sesquiterpene Lactones; in W. HERZ, H. GRISEBACH und G.W. KIRBY (Hrsg.): Progress in the Chemistry of Organic Natural Products; Bd. 38, S. 47-391, Springer-Verlag, Wien/New York, 1979

28. LIST, P.H. und B. DRIEBEL: Neue Inhaltsstoffe der Blüten von Arnica montana L.; Arzneim. Forsch. 24, 148-51 (1974)

29. HERRMANN, H.-D., G. WILLUHN und B.M. HAUSEN: Helenalinmethacrylate, a New Pseudoguaianolide from the Flowers of Arnica montana L. and the Sensitizing Capacity of their Sesquiterpene Lactones; Planta Med. 34, 299-304 (1978)

30. WILLUHN, G., P.-M. RÖTTGER und U. MATTHIESEN: Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinester aus Blüten von Arnica montana; Planta Med. 49, 226-31 (1983)

31. WILLUHN, G., P.-M. RÖTTGER und W. QUACK: Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität der Sesquiterpenlactone der Arnikablüten; Pharm. Ztg. 127, 2183-85 (1982)

32. JUNIOR, I.: Untersuchungen zur Inhaltsstoffführung der Blüten von Arnica chamissonis Less. ssp. genuina Maguire und Arnica sachalinensis (Regl.) A. Gray; Dissertation, Universität Düsseldorf, 1983

33. WILLUHN, G.: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. V. Gehalt und Gehaltsschwankungen an ätherischem Öl in den verschiedenen Organen von Arnica-Arten; Planta Med. 21, 221-45 (1972)

34. KELSEY, R.G. und F. SHAFIZADEH: Glandular Trichomes and Sesquiterpene Lactones of Artemisia nova (Asteraceae); Biochem. Syst. Ecol. 8, 371-77 (1980)

35. SCHNEIDER, G. und B. MIELKE: Zur Analytik der Bitterstoffe Absinthin, Artabsin und Matrizin aus Artemisia Absinthium L.; Dtsch. Apoth. Ztg. 118, 469-72 (1978)

36. POPLAWSKI, J., M. HOLUB, Z. SAMEK und V. HEROUT: On Terpenes. CCIX. Arnicolides - Sesquiterpenic Lactones from the Leaves of Arnica montana L.; Collect. Czech. Chem. Commun. 36, 2189-99 (1971)

37. WILLUHN, G., P.-M. RÖTTGER und D. WENDISCH: 6-O-Isobutyryl-tetrahydrohelenalin aus Blüten von Arnica montana; Planta Med., 35-37 (1984)

38. EVSTRATOVA, R.I., V.I. SHEICHENKO, K.S. RYBILKO und A.I. BAN'KOVSKII: The Structure of Arnifolin, a Sesquiterpene Lactone from Arnica foliosa Nutt. and Arnica montana L.; Khim. Farm. Zh., 39-45 (1969)

39. WILLUHN, G., I. JUNIOR, J. KRESKEN, G. PRETZSCH und D. WENDISCH: Sesquiterpenlactone aus Arnica chamissonis. IV. Ivalin und andere Sesquiterpenlactone aus den Blütenkörbchen der Subspecies genuina; Planta Med., 398-401 (1985)

40. PRETZSCH, G.: Die Sesquiterpenlactone der Blüten von Arnica chamissonis Less. subsp. genuina Maguire sowie Untersuchungen zur Steroidführung von Costus spiralis; Dissertation, Universität Düsseldorf, 1982

41. WILLUHN, G., G. PRETZSCH, D. WENDISCH: Zwei neue Pseudoguaianolide aus den Blüten von Arnica chamissonis Less. subsp. genuina Maguire; Tetrahedron 37, 773-76 (1981)

42. KRESKEN, J.: Die Sesquiterpenlactone in den Blüten der Unterarten und Varietäten von Arnica chamissonis Less. Dissertation, Universität Düsseldorf, 1984

43. WILLUHN, G., J. KRESKEN und D. WENDISCH: Sesquiterpenlactone aus Arnica chamissonis. III. 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid und 6-O-Propionyl-11,13-dihydrohelenalin; Planta Med. 47, 157-60 (1983)

44. HOLUB, M., Z. SAMEK und J. TOMAN: Carabrone from Arnica foliosa; Phytochemistry 11, 2627-28 (1972)

45. WILLUHN, G. und H.-D. HERRMANN: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. 9. Mitt.: Zwei Sesquiterpenlactone aus den Blüten von Arnica longifolia; Arch. Pharm. 309, 333-35 (1976)

46. WILLUHN, G. und H.-D. HERRMANN: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. 12. Mitt.: Xanthalongin, ein neues Xanthanolid aus den Blüten von Arnica longifolia; Planta Med. 37, 325-32 (1979)

47. HARBORNE, J.B.: The Biochemical Systematics of Flavonoids; in J.B. HARBORNE und T.J. MABRY: The Flavonoids: Advances in Research; S. 1057-95, Chapman and Hall, London/New York, 1982

48. ERDTMAN, H.: Some Aspects of Chemotaxonomy; in T. SWAIN: Chemical Plant Taxonomy; S. 89-126, Academic Press, London/New York, 1963

49. LA DUKE, J.C.: Flavonoid Chemistry and Systematics of Tithonia (Compositae); Amer. J. Bot. 69, 784-92 (1982)

50. WILLIAMS, C.A., A. DEMISSIE und J.B. HARBORNE: Flavonoids as Taxonomic Markers in Old World Lupinus Species; Biochem. Syst. Ecol. 11, 221-31 (1983)

51. SCHILLING, E.E. und T.J. MABRY: Flavonoids of Helianthus Series Corona-solis; Biochem. Syst. Ecol. 9, 161-63 (1981)

52. CRAWFORD, D.J. und E.B. SMITH: Leaf Flavonoid Chemistry of North American Coreopsis (Compositae): Intra- and Intersectinal Variation; Bot. Gaz. 144, 577-83 (1983)

53. BIERNER, M.W.: Flavonoids of Plummera: Taxonomic Implications at the Generic Level within the Gaillardiinae; Biochem. Syst. Ecol. 5, 293-95 (1978)

54. CALIE, P.J., E.E. SCHILLING und D.H. WEBB: Flavonoid Chemistry of the Generic Segregates Ascyrum and Crookea of Hypericum; Biochem. Syst. Ecol. 11, 107-09 (1983)

55. SANER, A. und K. LEUPIN: Beitrag zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Arnica montana L.; Pharm. Acta Helv. 41, 431-45 (1966)

56. BORKOWSKI, B., Z. KOWALEWSKI und L. SKRZPCZAKOWA: Studies on the Chemical Composition of the Inflorescence of some Species of the Genus Arnica. Part I. Analysis of Flavonoid Fractions (poln.); Diss. Pharm. Pharmacol. 18, 367-74 (1966)

57. FRIEDRICH, H.: Isoquercitin und Astragalin als Inhaltsstoffe der Blüten von A. montana L.; Naturwissenschaften 49, 541-42 (1962)

58. MARCHISHIN, S.M. und N.F. KOMISSARENKO: Components of Arnica montana and Arnica foliosa; Khim. Prir. Soedin. 662 (1981); C.A.: 96: 31675K

59. SHELYUTO, V.L., N.T. BUBON, V.I. PIOTUKH und L.P. SMIRNOVA: Flavonoids from Arnica foliosa; Khim. Prir. Soedin. 541-42 (1976)

60. MERFORT, I.: Methylierte Flavonoide aus Arnica montana und Arnica chamissonis; Planta Med. 107-08 (1984)

61. MERFORT, I.: Flavonoide aus Arnica montana und Arnica chamissonis; Planta Med. 136-38 (1984)

62. MERFORT, I.: unveröffentlicht

63. WOLLENWEBER, E. und V.H. DIETZ: Occurence and Distribution of Free Flavonoid Aglycones in Plants; Phytochemistry 20, 869-932 (1981)

64. SCHULTE, K.E., G. RÜCKER und K. REITHMAYR: Einige Inhaltsstoffe von Arnica chamissonis und anderer Arnica-Arten; Lloydia, 32, 350-68 (1969)

65. LABADIE, R.P.: Arnica montana L.; Pharm. Weekbl. 103, 769-74 (1968)

66. DUQUENOIS, P.: Une plante medicinale encore mysterieuse, l'Arnica montana; Pharm. Weekbl. 106, 190-97 (1971)

67. WURM, G., J. BAUMANN und U. GERES: Beeinflussung des Arachidonsäurestoffwechsels durch Flavonoide; Dtsch. Apoth. Ztg. 122, 2062-68 (1982)

68. WILLUHN, G.: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. VI. Charakterisierung und präparative Auftrennung der ätherischen Öle aus den Wurzeln, Rhizomen, Blättern und Blütenkörbchen verschiedener Arnica-Arten; Planta Med. 21, 329-42 (1972)

69. WILLUHN, G.: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. VII. Die Zusammensetzung des ätherischen Öles aus den unterirdischen Organen und Blütenkörbchen verschiedener Arnica-Arten; Planta Med. 22, 1-33 (1972)

70. WILLUHN, G.: T-Muurolol - Hauptbestandteil von Arnica longifolia; Phytochemistry 10, 901-02 (1972)

71. WILLUHN, G., R. SCHNEIDER und U. MATTHIESEN: Mexikanische Arnikablüten; Dtsch. Apoth. Ztg. 125, 1941-44 (1985)

72. RINN, W.: Isobuttersäurethymylester - Hauptbestandteil des ätherischen Öles der Rhizome und Wurzeln von Arnica chamissonis; Planta Med. 18, 147-47 (1970)

73. SCHMITZ, R., G. SCHADEN und H. KATING: 2-Methylbuttersäureester und 3-Methylbuttersäure-Thymylester im ätherischen Öl der unterirdischen Organe von A. alpine (L.) Olin.; Arch. Pharm. 312, 65-68 (1979)

74. SCHMITZ, R. und H. KATING: α-Bisabolol in A. amplexicaulis und A. chamissonis; Arch. Pharm. 312, 551-52 (1979)

75. SCHMITZ, R., A.W. FRAHM und H. KATING: Ein neues Sesquiterpenketon aus Arnica-Arten; Phytochemistry 19, 1477-80 (1980)

76. SCHMITZ, R. und H. KATING: Zur Frage des Thymol-Vorkommens in Arnica-Arten; Planta Med. 31, 311-14 (1977)

77. HERZ, W.: Biogenetic Aspects of Sesquiterpene Lactone Chemistry; Isr. J. Chem. 16, 32-44 (1977)

78. BOHLMANN, F., J. ZIESCHE, H. ROBINSON und R.M. KING: A Pseudoguaianolide and a Hydroxygeranylnerol from Kingianthus paradoxus; Phytochemistry 20, 1146-48 (1981)

79. BOHLMANN, F., C. ZDERO, R.M. KING und H. ROBINSON: Pseudoguaianolide und andere Sesquiterpene aus Monactis macbridei; Liebigs Ann. Chem. 503-11 (1984)

80. HERZ, W., V. SUDARSANAM und J.J. SCHMID: Constituents of Iva Species. VII. New Guaianolides from Iva axillaris Pursh. ssp. robustior; J. Org. Chem. 31, 3232-36 (1966)

81. ROMO DE VIVAR, A., A. CABREA, A. ORTEGA und J. ROMO: Constituents of Zaluzania Species - II. Structures of Zaluzanin C und Zaluzanin D; Tetrahedron 23, 3903-07 (1967)

82. HERZ, W., A. ROMO DE VIVAR und M.V. LAKSHMIKANTHAN: Constituents of Iva Species. IV. Structure of Pseudoivalin, a New Guaianolid; J. Org. Chem. 30, 118-22 (1965)

83. BOHLMANN, F. und C. ZDERO: Neue Guaianolide aus Lasthenia-Arten; Phytochemistry 17, 2032-33 (1978)

84. HERZ, W., P.S. SUBRAMANIAM und T.A. GEISSMAN: 3-Epiisotelekin from Gaillardia aristata Pursh. and the Structure of Farinosin; J. Org. Chem. 33, 3743-49 (1968)

85. WOLLENWEBER, E.: Flavones and Flavonols; in J.B. HARBORNE und T.J. MABRY (Hrsg.); The Flavonoids: Advances in Research; S. 189-259, Chapman and Hall, London/New York, 1982

86. STEINEGGER, E. und R. HÄNSEL: Lehrbuch der Pharmakognosie; Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York 1972

87. HARBORNE, J.B. und T.J. MABRY (Hrsg.): The Flavonoids: Advances in Research; Chapman and Hall, London/New York, 1982

88. HARBORNE, J.B., T.J. MABRY und H. MABRY (Hrsg.): The Flavonoids; Chapman and Hall, London, 1975

89. HARBORNE, J.B.: Comparative Biochemistry of the Flavonoids; Academic Press, London/New York 1967

90. HAHLBROCK, K.: Flavonoids; in P.K. STUMPF und E.E. CONN (Hrsg.): The Biochemistry of Plants; Bd. 7, S. 425-56, Academic Press, New York/London, 1981

91. SWAIN, T.: Nature and Properties of Flavonoids; in T.W. GOODWIN (Hrsg.): Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments; Bd. 1, S. 425-63, Acedemic Press, London, 1976

92. MARKHAM, K.R.: Techniques of Flavonoid Identification; Academic Press, London/New York, 1982

93. MABRY, T.J., K.R. MARKHAM und M.B. THOMAS: The Systematic Identification of Flavonoids; Springer-Verlag, New York/ Heidelberg/Berlin, 1970

94. GEISSMAN, T.A.: The Chemistry of Flavonoid Compounds; Pergamon Press, New York, 1962

95. HAHLBROCK, K. und H. GRISEBACH: Biosynthesis of Flavonoids; in J.B. HARBORNE, T.J. MABRY und H. MABRY (Hrsg.): The Flavonoids, S. 866-914, Chapman and Hall, London, 1975

96. EBEL, J. und K. HAHLBROCK: Biosynthesis; in J.B. HARBORNE und T.J. MABRY (Hrsg.): The Flavonoids: Advances in Research; S. 641-79, Chapman and Hall, London/New York 1982

97. BIRCH, A.J. und F.W. DONOVAN: Studies in Relation to Biosynthesis. I. Some Possible Routes to Derivatives of Orcinol and Phloroglucinol; Aust. J. Chem. 6, 360-68 (1953)

98. LYNEN, F. und M. TADA: Die biochemischen Grundlagen der "Polyacetat-Regel"; Angew. Chem. 73, 513-19 (1961)

99. WONG, E. und E. MOUSTAFA: Flavanone Biosynthesis; Tetrahedron Lett. 3021-22 (1966)

100. HAHLBROCK, K., H. ZILG und H. GRISEBACH: Stereochemistry of the Enzymatic Cyclisation of 4,2',4'-Trihydroxychalcone to 7,4'-Dihydroxyflavanone by Isomerases from Mung Bean Seedlings; Eur. J. Biochem. 15, 13-18 (1970)

101. POULTON, J.: Transmethylation and Demethylation Reactions in the Metabolism of Secondary Plant Products; in E.E. CONN und P.K. STUMPF (Hrsg.): The Biochemistry of Plants; Bd. 7, S. 667-723, Academic Press, New York/London, 1981

102. TSAI, L., R.J. HIGHET und W. HERZ: The Mass Spectra of Pseudoguaianolides Related to Helenalin; J. Org. Chem. 34, 945-48 (1969)

103. RÖTTGER, P.-M.: Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone aus den Blütenkörbchen von Arnica montana L.; Dissertation, Universität Düsseldorf, 1981

104. ADAMS, R. und W. HERZ: Helenalin. I. Isolation and Properties. II. Helenalin Oxide. III. Reduction and Dehydrogenation; J. Am. Chem. Soc. 71, 2546-59 (1949)

105. HERZ, W., R.B. MITRA und P. Jayaraman: Constituents of Helenium Species. VIII. Isolation and Structure of Balduilin; J. Am. Chem. Soc. 81, 6061-65 (1959)

106. LEE, K.-H., Y. IMAKURA, D. SIMS, A.T. McPHAIL und K.D. ONAN: Antitumor Sesquiterpene Lactones from Helenium microcephalum: Isolation of Mexicanin-E and Structural Characterization of Microhelenin-B and -C; Phytochemistry 16, 393-95 (1977)

107. HERRMANN, H.-D.: Die Sesquiterpenlactone der Blüten von Arnica longifolia Eat. und ihre Wirkungen; Dissertation, Universität Düsseldorf, 1978

108. WIEBCKE, M., J. KRESKEN, D. MOOTZ und G. WILLUHN: Sesquiterpenlactone aus Arnica chamissonis Less.: Röntgenstrukturanalyse von Chamissonolid; Tetrahedron 38, 2709-14 (1982)

109. HERZ, W., K. AOTA, M. HOLUB und Z. SAMEK: Sesquiterpene Lactones and Lactone Glycosides from Hymenoxys Species; J. Org. Chem. 35, 2611-24 (1970)

110. GÜNTHER, H.: NMR-Spektroskopie; Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1983

111. BOHLMANN, F., P.K. MAHANTA, J. JAKUPOVIC, R.C. RASTOGI und A.A. NATU: New Sesquiterpene Lactones from Inula Species; Phytochemistry 17, 1165-72 (1978)

112. BOHLMANN, F., C. ZDERO und M. AHMED: New Sesquiterpene Lactones, Geranyllinalol Derivates and other Constituents from Geigeria Species; Phytochemistry 21, 1679-91 (1982)

113. HERZ, W. und A. SRINIVASAN: Reexamination of Gaillardia amblydon: Isolation of New Pseudoguaianolides; Phytochemistry 13, 1187-92 (1974)

114. IMAKURA, Y., K.-H. LEE, D. SIMS und I.F. HALL: Antitumor Agents XXVIII: Structural Elucidation of the Novel Antitumor Sesquiterpen Lactone, Microlenin, from Helenium microcephalum; J. Pharm. Sci. 67, 1228-32 (1978)

115. BOHLMANN, F. und J. JAKUPOVIC: Zwei neue Sesquiterpenlactone und eine neue Sesquiterpensäure aus Helenium puberulum; Phytochemistry 18, 131-33 (1979)

116. HERZ, W., K. AOTA und A.L. HALL: New Pseudoguaianolides from Hymenoxys Species. A New Type of Lactone Closure; J. Org. Chem. 35, 4117-21 (1970)

117. HERZ, W., N. KUMAR und J.F. BLOUNT: Antileukemic C-15-Functionalized Ambrodamolides from Rudbeckia mollis; J. Org. Chem. 46, 1356-61 (1981)

118. KONDO, Y., F. HAMADA und F. YOSHIZAKI: 2-Methoxydihydrohelenalin from the Rhizoma of Sendai Helenium autumnale L.; Heterocycles 5, 373-76 (1976)

119. DOMINGUEZ, X.A., R. FRANCO, F. BOHLMANN und R. BOHLMANN: A Pseudoguaianolide from Hymenoxy linearifolia; Phytochemistry 19, 2204-05 (1980)

120. HERZ, W., K. AOTA, A.L. HALL und A. SRINIVASAN: Antileukemic Pseudoguaianolides from Hymenoxys grandiflora (T. & G.) Parker. Application of Lanthanide-Induced Shifts to Structure Determination; J. Org. Chem. 39, 2013-18 (1974)

121. SAMEK, Z., M. HOLUB, V.J. NOVIKOV, J.N. FOROSTJAN und D.P. POPA: On Terpenes. CCVIII. The Structure of Ivoxanthin, a Sesquiterpenic Lactone from Cyclachaena xanthifolia Fresen; Collect. Czech. Chem. Commun. 35, 3818-21 (1970)

122. HERZ, W., A. ROMO DE VIVAR, J. ROMO und N. VISWANATHAN: Constituents of Helenium Species. XIII. The Structure of Helenalin and Mexicanin A; J. Am. Chem. Soc. 85, 19-27 (1963)

123. LULEY, C.: laufende Dissertation, Universität Düsseldorf

124. HOMBERG, H. und H. GEIGER: Fluorescenz und Struktur von Flavonen; Phytochemistry 19, 2443-49 (1980)

125. WOLLENWEBER, E.: Dünnschicht-Chromatographie von Flavonoiden auf Polyamid-Schichten; Supplement Chromatographie Juli 1982, G-I-T Verlag Ernst Giebler

126. GOTTLIEB, O.R.: Flavonols; in J.B. HARBORNE, T.J. MABRY und H. MABRY (Hrsg.): The Flavonoids; S. 296-375, Chapman and Hall, London, 1975

127. BACON, J.D., T.J. MABRY und J.A. MEARS: UV-spectral Procedures for Distinguishing Free and Substituted 7-Hydroxyl Groups in Flavones and Flavonols; Rev. Latinoamer. Quim. 7, 83-86 (1976)

128. JAY, M., J.-F. GONNET, E. WOLLENWEBER und B. VOIRIN: Sur l'analyse qualitative des aglycones flavoniques dans une optique chiniotaxinomique; Phytochemistry 14, 1605-12 (1975)

129. SYUKAVKINA, N.A. und N.N. POGODAEVA: Ultraviolet Absorption of Flavonoids. VIII. Ionization Constants of Kaempferol and Quercetin; Khim. Prir. Soedin. 6, 708-11 (1975)

130. VOIRIN, B.: UV Spectral Differentiation of 5-Hydroxy- and 5-Hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') or tri-(3',4',5')-Substituted B-Rings; Phytochemistry 22, 2107-45 (1983)

131. JURD, L.: Aluminium Complexes of Phenolic Flavones. Spectral and Structural Correlations; Phytochemistry 8, 445-62 (1969)

132. BOUZID, N., I. FOURASTE, B. VOIRIN, J. FAVRE-BONVIN und PH. LEBRETON: A Methylated Flavone from Artemisia mesatlantica; Phytochemistry 21, 803-04 (1982)

133. REED, R.J. und J.M. WILSON: Electron Impact and Molecular Dissociation. Part XII. The Cracking Patterns of some Rotenoids and Flavones; J. Chem. Soc. 5949-56 (1963)

134. PELTER, A., P. STAINTON und M. BARBER: The Mass Spectra of Oxygen Heterocycles. II. The Mass Spectra of some Flavonoids; J. Heterocyclic. Chem. 2, 262-71 (1965)

135. AUDIER, H.: Nr. 484 - Etude des Composés Flavoniques par Spectrométrie de masse; Bull. Soc. Chim. France 2892-99 (1966)

136. KINGSTON, D.G.I.: Mass Spectrometry of Organic Compounds - VI. Electron-Impact Spectra of Flavonoid Compounds; Tetrahedron 27, 2691-2700 (1971)

137. MABRY, T.J. und K.R. MARKHAM: Mass Spectrometry of Flavonoids; in J.B. HARBORNE, T.J. MABRY und H. MABRY (Hrsg.): The Flavonoids; S. 78-126, Chapman and Hall, London, 1975

138. BOWIE, J.H. und D.W. CAMERON: Electron Impact Studies. II. Mass Spectra of Quercetagetin Derivates; Aust. J. Chem. 19, 1627-35 (1966)

139. GOUDARD, M., J. FAVRE-BONVIN, PH. LEBRETON und J. CHOPIN: Differentiation des Dihydroxy-5,7-methoxy-6 ou 8 Flavones Flavonols et Methyl-3-Flavonols par Spectrometrie de masse; Phytochemistry 17, 145-48 (1978)

140. GOUDARD, M., J. FAVRE-BONVIN, J. STRELISKY, M. NOGRADI und J. CHOPIN: Differentiation des Hydroxy-5-dimethoxy-6,7 ou 7,8 et des Trimethoxy-5,6,7 ou 5,7,8 Flavones par Spectrometrie de masse; Phytochemistry 18, 186-87 (1979)

141. SILVA, M., J.M. MUNDACA und P.G. SAMMES: Flavonoid and Triterpene Constituents of Baccharis rhomboidalis; Phytochemistry 10, 1942-43 (1971)

142. MARKHAM, K.R. und T.J. MABRY: Ultraviolet-visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids: in J.B. HARBORNE, T.J. MABRY und H. MABRY (Hrsg.): The Flavonoids; S. 45-77, Chapman and Hall, London, 1975

143. ENSEMEYER, M. und L. LANGHAMMER: Zwei lipophile Flavonoide aus Begonia glabra; Planta Med. 46, 254-55 (1982)

144. MASSICOT, J. und J.-P. MARTHE: Nr. 336 - Résonance magnétique nucléaire de produits naturels. III. - Étude de quelques dérivés flaconiques et substances apparentées; Bull. Soc. Chem. France, 1962-70 (1962)

145. DAWSON, R.M., C.A. HENRICK, P.R. JEFFRIES und E.J. MIDDLETON: The Chemistry of the Euphobiaceae. The Flavones from a Beyeria sp.; Aust. J. Chem. 18, 1871-75 (1965)

146. AHMAD, S.: Isolation of 5-Hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone from Gonystylus bancynus; Planta Med. 48, 62-63 (1983)

147. BAUER, K.H. und H. DIETRICH: Der Farbstoff der Birkenknospen; Ber. Dtsch. Chem. Ges. 66, 1053-54 (1933)

148. WOLLENWEBER, E. und K. EGGER: Flavonoid-Aglykone im Knospen-Exkret von Betula ermani; Z. Pflanzenphysiol. 65, 427-31 (1971)

149. WOLLENWEBER, E.: Flavonoid Exudations in Farinosa Ferns; Phytochemistry 15, 2013 (1976)

150. WOLLENWEBER, E.: Flavonoidmuster im Knospenexkret der Betulaceen; Biochem. Syst. Ecol. 3, 47-52 (1975)

151. WOLLENWEBER, E. und V.H. DIETZ: Flavonoid Patterns in the Farine of Goldenback and Silverback Ferns; Biochem. Syst. Ecol. 8, 21-33 (1980)

152. DHAR, K.L., C.K. ATAL und A. PELTER: Flavonoid Compounds from Piper peepuloides; Planta Med. 18, 332-35 (1970)

153. BRIESKORN, C.H. und H. MICHEL: Flavone aus dem Blatt von Rosmarinus officinalis L.; Tetrahedron Lett. 3447-48 (1968)

154. CAMARASA, J., S. CANIGUERAL, J. IGLESIAS und E. MARTIN: Sur les aglycones flavoniques des feuilles de Salvia verbenaca L.: Hydroxy-5-dimethoxy-7,4'-flavone, flavonoide nouveau pour le genre Salvia L.; Plant. Med. Phytother. 192-96 (1982)

155. GONZALEZ, A.G., B.M. FRAGA, M.G. HERNANDEZ, F. LARRUGA, J.G. LUIS und A.G. RAVELO: Flavones from some Canary Species of Sideritis; Lloydia, 41, 279-80 (1978)

156. BANDONI, A.L., J.E. MEDINA, R.V.D. RONDINA und J.D. COUSSIO: Genus Baccharis L. I: Phytochemical Analysis of a non Polar Fraction from B. crispa Sprengel; Planta Med. 34, 328-31 (1978)

157. DE PASCUAL TERESA, J., I.S. MARCOS, J.G. URONES, M.J. SEXMERO, P. BASABE und M.S. CINOS: Componentes de Cistus clusii; An. Quim. 79, 40-42 (1983)

158. JAIPETCH, T., V. REUTRAKUI, P. TUNTIWACHWUTTIKUI und T. SANTISUK: Flavonoids in the Black Rhizomes of Boesenbergia pandurata; Phytochemistry 22, 625-26 (1983)

159. SAKAKIBARA, M., D. DIFEO, J.N. NAKATANI, B. TIMMERMANN und T.J. MABRY: Flavonoid Methyl Ethers on the External Leaf Surface of Larrea Tridentata and L. Divaricata; Phytochemistry 15, 727-31 (1976)

160. WOLF, S.J. und K.E. DENFORD: Flavonoid Variation in Arnica cordifolia: an Apomictic Polyploid Complex; Biochem. Syst. Ecol. 11, 111-14 (1983)

161. PROKOSCH, P. und P.-G. GÖLZ: Methylated Flavonoids from Cistus ladanifer and Cistus palhinhae and their Taxonomic Implications; Phytochemistry 23, 470-71 (1984)

162. STAR, A.E. und T.J. MABRY: Filicinae: Gymnogrammaceae: Flavonoid Frond Exudates from two Jamaican Ferns, Pityrogramma tartarea and P. calomelanos; Phytochemistry 10, 2817-18 (1971)

163. ADZET, T. und F. MARTINEZ: Flavonoids in the Leaves of Thymus: A Chemotaxonomic Survey; Biochem. Syst. Ecol. 9, 293-95 (1981)

164. HERZ, W., S. GIBAJA, S.V. BHAT und A. SRINIVASAN: Dihydroflavonols and Other Flavonoids of Eupatorium Species; Phytochemistry 11, 2859-63 (1972)

165. ULUBELEN, A. und S. ÖKSÖZ: Cytotoxic Flavones from Centaurea urvillei; J. Nat. Prod. 45, 373 (1982)

166. WOLLENWEBER, E.: Flavonoidmuster als systematisches Merkmal in der Gattung Populus; Biochem. Syst. Ecol. 3, 35-45 (1975)

167. YOUNG, D.A.: Leaf Flavonoids of Eupomatiaceae; Biochem. Syst. Ecol. 11, 209-10 (1983)

168. HOROWITZ, R.M. und L. JURD: Spectral Studies on Flavonoid Compounds. II. Isoflavones and Flavones; J. Org. Chem. 26, 2446-49 (1961)

169. LAM, J. und P. WRANG: Flavonoids and Polyacetylenes in Dahlia tenuicaulis; Phytochemistry 14, 1621-23 (1975)

170. WOLLENWEBER, E., V.H. DIETZ, D. SCHILLO und G. SCHILLING: A Series of Novel Flavanones from Fern Exudates; Z. Naturforsch. 35c, 685-90 (1980)

171. GÜNZLER, H. und H. BÖCK: IR-Spektroskopie. Eine Einführung; Verlag Chemie, Weinheim 1983

172. GEISSMAN, T., R. MUKHERJEE und K.Y. SIM: Constituents of Helichrysum viscosum var. Bractestum DC; Phytochemistry 6, 1575-81 (1967)

173. ARENE, E.O., G.R. PETTIT und R.H. ODE: The Isolation of Isosakuranetin Methyl Ether from Eupatorium odoratum, Lloydia 41, 68-70 (1978)

174. BOHLMANN, F., C. ZDERO, R.M. KING und H. ROBINSON: Seven Guaianolides from the Tribe Vernonieae; Phytochemistry 2669-73 (1980)

175. BURRET, F., PH. LEBRETON und B. VOIRIN: Les Aglycones Flavoniques de Cactees: Distribution, Signification; J. Nat. Prod. 45, 687-93 (1982)

176. CHRISTIANSEN, K. und P.M. BOLL: A New Flavanone from Peach Bark; Tetrahedron Lett. 1293-97 (1966)

177. WOLLENWEBER, E.: Unusual Flavanones from a Rare American Fern; Z. Naturforsch. 36c, 604-06 (1981)

178. JAIN, A.C. und B.N. SHARMA: Synthesis of 7,3'- and 7,4'-Di-O-Methyleriodictyol and of Velutin and Pilloin; Phytochemistry 12, 1455-58 (1973)

179. SADYKOV, A.A. und A.S. SADYKOV: Phenolic Compounds of Persica vulgaris; Khim. Prir. Soedin. 15, 273-78 (1979) (Engl. Trans.)

180. DOMINGUEZ, X.A. und E. ROEHLL DE LA FUENTE: Sakuranetin and Pulcherryl Acetate from Eupatorium harvense; Phytochemistry 12, 2060 (1983)

181. BOHLMANN, F. und C. ZDERO: Inhaltsstoffe der Gattung Polymnia; Phytochemistry 16, 492-93 (1977)

182. BOHLMANN, F., P. SINGH, J. JAKUPOVIC, H. ROBINSON und R.M. KING: An Epoxygermacranolide and Further Constituents from Mikania Species; Phytochemistry 21, 705-07 (1982)

183. BOHLMANN, F., M.W. KNAUF, R.M. KING und H. ROBINSON: Ein neues Diterpen und weitere Inhaltsstoffe aus Baccharis-Arten; Phytochemistry 18, 1011-14 (1979)

184. LE QUESNE, P.W., M.P. PASTORE und R.F. RAFFAUF: The Cytotoxic Flavonoids of Lychnophara affinis; Lloydia 39, 391-94 (1976)

185. ULUBELEN, A. und J. UYGUR: Flavonoidal and Other Compounds of Salvia aethiopis; Planta Med. 29, 318-20 (1976)

186. DOMINGUEZ, X.A. und M. HINOJOSA: Mexican Medicinal Plants. XXVIII: Isolation of 5-Hydroxy-7,3',4'-trimethoxyflavone from Turnera diffusa; Planta Med. 30, 68-71 (1976)

187. RODRIGUEZ, B.: 5,4'-Dihydroxy-6,7,8,3'-tetramethoxyflavone from Sideritis mungronensis; Phytochemistry 16, 800-01 (1977)

188. DAS, K.C., W.J. FARMER und B. WEINSTEIN: Phytochemical Studies. IX. A New Flavone, Velutin; J. Org. Chem. 35, 3989-90 (1970)

189. AMARO, J.M. und MORALES MENDEZ: Estudio Fitoquimico de la Flora Andina Venezolana II. Flavonoides de la Chromolaena meridensis; Rev. Latinoamer. Quim. 14, 86-89 (1983)

190. WILLIAMS, C.A. und W.J. HARVEY: Leaf Flavonoid Pattern in the Winteraceae; Phytochemistry 21, 329-37 (1982)

191. SAKAKIBARA, M. und T.J. MABRY: A UV Procedure for distinguishing 5-Hydroxy-6-methoxyl from 5,6-Dihydroxyl Systems in Flavones and 3-O-Substituted Flavonols; Rev. Latinoamer. Quim. 8, 99-100 (1977)

192. MUES, R., B.N. TIMMERMANN, N. OHNO und T.J. MABRY: 6-Methoxyflavonoids from Brickellia californica; Phytochemistry 18, 1379-83 (1979)

193. IZADDOOST, M., A. RUSTAIYAN, A. NIKNEJAD und Z. SHARIF: Phytochemical Study of Zhumeria majdae; Fitoterapia 54, 67-69 (1983)

194. BRIESKORN, C.H. und W. BIECHELE: 6-Methoxygenkwanin - Ein weiteres Flavon aus Labiaten; Tetrahedron Lett. 2603-05 (1969)

195. BRIESKORN, C.H. und W. BIECHELE: Flavone aus Salvia officinalis L.; Arch. Pharm. 304, 557-61 (1971)

196. BRIESKORN, C.H. und W. RIEDEL: Flavonoide aus Coleus amboinicus; Planta Med. 31, 308-10 (1977)

197. ULUBELEN, A., M. MISKI, P. NEUMAN und T.J. MABRY: Flavonoids of Salvia tomentosa (Labiatae); J. Nat. Prod. 42, 261-62 (1979)

198. MARKHAM, K.R.: Revised Structures for the Flavones Cirsitakaoside and Cirsitakaogenin; Phytochemistry 22, 316-17 (1983)

199. RAO, M.M., D.G.I. KINGSTON und T.D. SPITTLER: Flavonoids from Flourensia cernua; Phytochemistry 9, 227-28 (1970)

200. EL-MASRY, S., A.A. OMAR, M.I.A. ABOU-SHOER und M.R.I. SALEH: Flavonoid Constituents of Aegialophila pumila; Planta Med. 42, 199-201 (1981)

201. WOLLENWEBER, E.: New Flavonoids from Betula nigra; Phytochemistry 16, 295 (1977)

202. DE PASCUAL TERESA, J., F. DIAZ, J. SANCHEZ, J.M. HERNANDEZ und M. GRANDE: Flavonoids from Digitalis thapsi; Planta Med. 38, 271-72 (1980)

203. REYNOLDS, G.W. und E. RODRIGUEZ: Prenylated Phenols that Cause Contact Dermatitis from Trichomes of Phacelia ixodes; Planta Med. 43, 187-93 (1981)

204. WILLUHN, G.: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. II. Der Gehalt an ätherischem Öl in Wurzeln und Rhizomen verschiedener Arnica-Arten; Planta Med. 17, 127-38 (1969)

205. KATING, H., W RINN und G. WILLUHN: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. III. Die Fettsäuren in den ätherischen Ölen der Blüten verschiedener Arnica-Arten; Planta Med. 18, 130-46 (1970)

206. SCHNEIDER, R.: Die Zusammensetzung des ätherischen Öles von Heterotheca inuloides Cass. ("Mexikanische Arnikablüten") und weitere lipophile Inhaltsstoffe; Dissertation, Universität Düsseldorf, 1984

207. PRETSCH, E., T. CLERC, J. SEIBL und W. SIMON: Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden; Springer Verlag, Berlin/ Heidelberg/New York, 1981

208. DEUEL, P.G. und T.A. GEISSMAN: Xanthinin. II. The Structures of Xanthinin and Xanthatin; J. Am. Chem. Soc. 79, 3778-83 (1957)

209. JONES, R.N., C.L. ANGELL, T. ITO und R.J.D. SMITH: The Carbonyl Streching Bands in the Infrared Spectra of Unsaturated Lactones; Canad. J. Chem. 37, 2007-22 (1959)

210. KONOVALOVA, O.A., K.S. RYBALKO und V.S. KABANOV: Sesquiterpene Lactones from Carpesium eximium; Khim. Prir. Soedin., 721-24 (1972)

211. VICHNEWSKI, W., J.K. SHUHAMA, R.C. ROSANSKE und W. HERZ: Granilin and Ivasperin from Ambrosia polystachya. ^{13}C-NMR Spectra of Hydroxylated Isoalantones; Phytochemistry 15, 1531-31 (1976)

212. HERZ, W. und G. HÖGENAUER: Ivalin, a New Sesquiterpene Lactone; J. Org. Chem. 27, 905-10 (1962)

213. VOGELZANG, M.E., N.M.J. VERMEULEN, D.J.J. POTGIETER und H.F. STRAUSS: Ivalin in Geigeria aspera; Phytochemistry 17, 2030-31 (1978)

214. BJELDANES, L.F. und T.A. GEISSMAN: Sesquiterpene Lactones: Constituents of an F_1 Hybrid Encelia farinosa x Encelia californica; Phytochemistry 10, 1079-81 (1971)

215. MARUYAMA, M. und F. SHIBATA: Stereochemistry of Granilin Isolated from Carpesium abrotanoides; Phytochemistry 14, 2247-48 (1975)

216. HERZ, W. und N. VISWANATHAN: Constituents of Iva Species. II. The Structures of Asperilin und Ivasperin, Two New Sesquiterpene Lactones; J. Org. Chem. 29, 1022-26 (1964)

217. YOSHIOKA, H., W. RENOLD, N.H. FISCHER, A. HIGO und T.J. MABRY: Sesquiterpene Lactones from Ambrosia confertiflora (Compositae); Phytochemistry 9, 823-32 (1970)

218. OBER, A.G., L. QUIJANO, L.E. URBATSCH und N.H. FISCHER: Eudesmanolides from Calea trichomata; Phytochemistry 23, 910-12 (1984)

219. BOHLMANN, F., J. JAKUPOVIC, M. AHMED und A. SCHUSTER: Sesquiterpene Lactones and other Constituents from Schistostephium Species; Phytochemistry 22, 1623-36 (1983)

220. HERZ, W. und P. KULATHAIVEL: Eudesmanolides and Ent-Pimaranes from Liatris laevigata; Phytochemistry 22, 715-20 (1983)

221. BOHLMANN, F., R.K. GUPTA, J. JAKUPOVIC, R.M. KING und H. ROBINSON: Eudesmanolides and Heliangolides from Calea rotundifolia; Phytochemistry 20, 1635-37 (1981)

222. BOHLMANN, F., A. ADLER, J. JAKUPOVIC, R.M. KING und H. ROBINSON: A Dimeric Germacranolide and Other Sesquiterpene Lactones from Mikania Species; Phytochemistry 21, 1349-55 (1982)

223. HOENEISEN, M., M. SICVA und F. BOHLMANN: Sesquiterpene Lactones of Podanthus mitiqui; Phytochemistry 19, 2765-66 (1980)

224. BOHLMANN, F. und M. LONITZ: Natürlich vorkommende Terpen-Derivate, 117. Neue Sandaracopimardien-Derivate, Sesquiterpene und Sesquiterpenlactone aus Zexmenia-Arten; Chem. Ber. 111, 843-52 (1978)

225. BOHLMANN, F., J. JAKUPOVIC und A. SCHUSTER: Further Eudesmanolides and Xanthanolides from Telekia speciosa; Phytochemistry 20, 1891-93 (1981)

226. BOHLMANN, F. und P.K. MAHANTA: Zwei neue Pseudoguaianolide aus Telekia speciosa; Phytochemistry 18, 887-88 (1979)

227. VAN ASWEGEN, C.H., N.M.J. VERMEULEN und D.J.J. POTGIETER: Inhibition of Oxidative Phosphorylation by Sesquiterpene Lactones from Geigeria aspera; S. Afr. J. Sci. 75, 84-85 (1979)

228. VAN ASWEGEN, C.H., D.J.J. POTGIETER und N.M.J. VERMEULEN: Sire of Respiratory Inhibition by Sesquiterpene Lactones from Geigeria; S. Afr. J. Sci. 78, 125-27 (1982)

229. NAGASAMPAGI, B., J.S. SOHONI, F. BOHLMANN und C. ZDERO: A Eudesmanolide and a Guaianolide from Cyathocline purpurea; Phytochemistry 20, 2034-36 (1981)

230. HERZ, W. und N. KUMAR: Sesquiterpene Lactones of Baltimora recta; Phytochemistry 18, 1143-45 (1979)

231. VENDANTHAM, T.N.C., S. SANKARA SUBRAMANIAN und J.B. HARBORNE: 4'-Methylscutellarein and Pectolinarigenin from Clerodendron inerme; Phytochemistry 16, 294 (1977)

232. SANKARA SUBRAMANIAN, S. und A.G.R. NAIR: Scutellarein and Pectolinarigenin from the Leaves of Clerodendron phlomides an Duranta repens; Phytochemistry 11, 3095-96 (1972)

233. IMRE, S., A. ÖZTUNC und H. WAGNER: Flavone und Anthrachinone aus den Blättern von Digitalis schischkinii; Phytochemistry 16, 799-800 (1977)

234. FORGACS P., J.F. DESCONLOIS und J. DUBEC: Flavones et Sesquiterpene Lactones de Volutarella divaricata; Planta Med. 42, 284-87 (1981)

235. BECCHI, M. und M. CARRIER: 6-Methoxy Flavones of Santolina chamaecyparissus; Planta Med. 38, 267-8 (1980)

236. CRONQUIST, A.: Compositae; in C.L. HITCHCOCK, M. OMNBEY und J.W. THOMPSON (Hrsg.): Vascular Plants of the Pacific Northwest; Princeton Univ. Press, Princeton, N. J., 1955 (zitiert nach [24])

237. EDIGER, R.J. und T. BARKLEY: Arnica; in C.T. ROGERSON (Hrsg.): North American Flora. Series II, Part 10, N.Y. Botanical Garden, 1978 (zitiert nach [24])

238. MITCHELL, D.R. und R.O. ASPLUND: Pulchelinns-C and-E in Gaillardia aristata; Phytochemistry 12, 2541 (1973)

239. MEARS, J.A.: The Evolution of the Pseudoguaianolides of Parthenium L. (Asteraceae, Ambrosiinae); Proc. Aced. Nat. Sci. Philadelphia 132, 156-72 (1980)

240. ORGANIKUM. Organisch-chemisches Grundpraktikum, 15. Auflage. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1976

241. JAKUPOVIC, J.: Neue natürlich vorkommende Verbindungen in Compositen; Dissertation, TU Berlin, 1979

242. PAPAY, V., L. TOTH, K. OSVATH und GY. BUJTAS: Über die Flavonoide von Verbascum phlomoides L.; Pharmazie 35, 334-5 (1980)

243. PHADKE, P.S., A.V. RAMA RAO und K. VENKATARAMAN: Synthetic Experiments in the Chromone Group: Part XXXVI - A Synthetic of Dinatin; Indian J. Chem. 131-3 (1967)

244. LEBRETON, PH., E. WOLLENWEBER, L. SOUTHWICK und T.J. MABRY: Sur la tétrahydroxy-3,4',5,7 méthoxy-6 flavone, ou méthoxy-6 kaempférol, nouveau composé naturel, extrait de Prunus avium L. var. juliana (L.) Koch.; C.R. Acad. Sc. Paris, 1529-32 (1971)

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

A	Aceton
A.	Arnica
br	breit (Spektrenbanden)
C	Chloroform
d	Dublett
DC, dc	Dünnschichtchromatogramm, -graphie, -graphisch
dd	Doppeldublett
E	Diethylether
Fl	Flavonoid, -e
GC, gc	Gaschromatogramm, -graphie, -graphisch
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
i-Prop	i-Propanol
Lsm.	Lösungsmittel
m	Multiplett
M	Methanol
M^+	Molekülion
MG	Molekulargewicht
NA	Naturstoffreagenz A
P	n-Pentan
PE	Petrolether (Sdp. 40-60°C)
q	Quartett
R_f	Laufstreckenquotient (DC)
RDA	Retro-Diels-Alder
RT	Retentionszeit
s	Singulett
SC, sc	Säulenchromatographie, -graphisch
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
Sl	Sesquiterpenlacton
t	Triplett

LEBENSLAUF

7.4.1951	Marion E B E R T, geboren am in Berlin Eltern: Margot Frieburg, geb. Schwenger Rudi Frieburg
1958-1962	Besuch der Grundschule in Ulm/Donau
1962	Eintritt in die Elly-Heuß-Realschule in Ulm/Donau
6.7.1967	Abschlußprüfung der "Mittleren Reife"
10/1967-3/1970	Ausbildung zur Chemisch-biologisch-technischen Assistentin im Lette-Verein Berlin
4/1970-4/1975	Angestellt als Chemisch-technische Assistentin beim Landeskriminalamt Berlin
10/1972-3/1974	Besuch eines Abendgymnasiums in Berlin
27.6.1974	Reifeprüfung
4/1975-3/1980	Chemiestudium an der Technischen Universität Berlin; Diplomarbeit auf dem Gebiet der Molekularbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kleinkauf
10/1979-3/1980	Studentische Hilfskraft am Institut für Biochemie und Molekulare Biologie der TU Berlin
6/1980-11/1980	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am o.g. Institut
3/1981-9/1985	Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. G. Willuhn
3/1981-9/1981	Wissenschaftliche Hiltskraft und vom
10/1981-9/1985	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf
seit 2/1980	verheiratet mit dem Chemiker Dr. Wolfgang Ebert
seit 10/1984	eine Tochter, Kirstin Jennifer

U.GILBERT "DER DRUCKER" BUSCHEYPLATZ 3, 4630 BOCHUM-QUERENBURG TEL.:(0234) 704